

Molekulare Analyse des probiotischen Stamms
***Escherichia coli* Nissle 1917**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

der
Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

vorgelegt von

Dipl. Biol. Dorothea Susanne Schmidt
geboren am 25. Februar 1976 in Hamburg

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Isolde Röske
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Florian Gunzer
3. Gutachter: Herr Prof. Dr. Jan Buer

Eingereicht am 23. Januar 2009

Tag der Verteidigung: 15. Mai 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die intestinale Mikroflora des Menschen	1
1.2	Die Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora.....	3
1.3	Kommensale und pathogene <i>E. coli</i>	4
1.4	Genomorganisation und Genregulation bei <i>E. coli</i>	6
1.4.1	Dynamik der Bakteriengenome	6
1.4.2	Bakterielle Genregulation durch Promotoren	7
1.5	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	7
1.6	Probiotika.....	10
1.6.1	Geschichte der Probiotika	10
1.6.2	Definition eines Probiotikums	10
1.6.3	Probiotika als therapeutische Alternativen	12
1.6.4	Der probiotische Effekt.....	13
1.7	Der probiotische Stamm <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	16
1.7.1	Vom Stuhlisolat zum Probiotikum	16
1.7.2	Stammcharakteristika von EcN	18
1.8	Aufgabenstellung und Zielsetzung	21
2	Material	22
2.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	22
2.2	Puffer und Stammlösungen.....	22
2.3	Nährmedien und Lösungen für Bakterienkulturen	23
2.4	Antibiotika	24
2.5	Bakterienstämme	25
2.6	Plasmide.....	25
2.7	Zellkulturmedien und Reagenzien	27
2.8	Zelllinien.....	27
2.9	Oligonukleotide	28
2.10	Software	28

3	Methoden.....	29
3.1	Kultivierung von prokaryotischen Zellen.....	29
3.1.1	Anzucht, Wachstumsbedingungen und Stammhaltung von Bakterien...	29
3.1.2	Bakterienwachstum in Flüssigkulturen.....	29
3.1.3	Wachstumskurven.....	30
3.2	Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	30
3.3	Molekularbiologische Methoden	31
3.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
3.3.2	Fusions-PCR	32
3.3.3	Sequenzierung kurzer DNA-Fragmente	33
3.3.4	Isolierung von DNA und RNA	34
3.3.4.1	Präparation von genomischer DNA.....	34
3.3.4.2	Präparation von Plasmid-DNA	34
3.3.4.3	Isolierung von RNA.....	34
3.3.5	cDNA-Synthese	35
3.3.6	Quantitative Realtime-PCR	35
3.3.7	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese	36
3.3.8	Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen.....	36
3.3.8.1	Bestimmung der DNA-Konzentration im Agarosegel.....	36
3.3.8.2	Photometrische Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration	36
3.3.9	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	37
3.3.9.1	Isolierung und Ankonzentrierung von DNA über eine Säule.....	37
3.3.9.2	Gelextraktion von DNA-Fragmenten	37
3.3.9.3	Aufreinigung von Sequenzierprodukten.....	38
3.3.9.4	Ethanol-fällung.....	38
3.3.10	Modifikation und Klonierung von DNA	38
3.3.10.1	Restriktionsenzyme.....	38
3.3.10.2	T4-DNA-Polymerase	39
3.3.10.3	Dephosphorylierung.....	39
3.3.10.4	Ligation.....	39
3.3.11	Kolonie-Blot	40
3.4	Genetische Manipulation von <i>E. coli</i>	41

3.4.1	Transformation durch Elektroporation	41
3.4.1.1	Herstellung elektrokompenter Zellen	41
3.4.1.2	Elektroporation	41
3.4.2	Erzeugung von <i>E. coli</i> -Mutanten mittels Suizidvektor.....	42
3.4.3	Narbenlose Deletionen im <i>E. coli</i> -Genom (Scarless Engineering).....	44
3.5	Säureresistenztest.....	46
3.6	Co-Kultivierung von pro- und eukaryotischen Zellen.....	47
3.6.1	Adhärenzassay	47
3.6.2	Invasionsassay	48
3.6.3	Konfokalmikroskopie	49
3.6.4	Co-Kultur-Assay für Expressionsanalysen.....	50
3.7	Promotor-Reporter-Fusionbibliothek (Promotorbank).....	51
3.7.1	Herstellung einer EcN-Promotorbank	51
3.7.2	Sortierung und Identifizierung intestinal <i>in vivo</i> regulierter Gene	52
3.8	<i>lux</i> -Reporter-gen-Assay	55
3.9	Genomsequenzierung und Annotation.....	56
3.9.1	Das Genom von EcN	56
3.9.1.1	Die Plasmide pMUT1 und pMUT2 von EcN	56
3.10	Vergleich von <i>E. coli</i> -Genomen	57
3.10.1	Berechnung des Kerngenoms und stammspezifischer Gene	57
3.10.2	Phylogenetische Analyse	57
3.10.3	Homologievergleich vollständiger Genome	57
3.11	Tierversuche.....	58
3.12	Sicherheit	58
4	Ergebnisse	59
4.1	Analyse des Genoms von EcN.....	59
4.1.1	Das annotierte Genom	59
4.1.2	Die kryptischen Plasmide pMUT1 und pMUT2.....	61
4.1.3	Vergleich des EcN-Genoms mit 13 weiteren <i>E. coli</i> -Genomen	62
4.1.4	Horizontaler Gentransfer und genomische Inseln in EcN	67
4.1.4.1	Identifizierung der genomischen Inseln in EcN	67
4.1.4.2	GEI III und die genetisch variable Region <i>dsdCXA-argW</i>	71

4.1.5	Homologie von EcN und <i>E. coli</i> CFT073.....	72
4.1.5.1	Vergleich der Genomstrukturen von EcN und <i>E. coli</i> CFT073.....	75
4.1.5.2	Virulenz- und Fitnessfaktoren	76
4.1.6	Genotyp des alternativen Sigma-Faktors RpoS von EcN.....	82
4.1.7	Funktionalität von RpoS und der Einfluss auf die Säureresistenz.....	83
4.2	Molekulare Analyse probiotischer Eigenschaften von EcN.....	87
4.2.1	Einfluss von <i>E.coli</i> -Mutanten auf die Genregulation in Lovo-Zellen	87
4.2.1.1	Erzeugung von <i>E. coli</i> -Mutanten für Co-Kulturexperimente	87
4.2.1.2	mRNA-Expression in Lovo-Zellen.....	88
4.2.2	Analyse EcN-spezifischer Eigenschaften mit Deletionsmutanten.....	90
4.2.3	Adhärenzassay mit EcN Wildtyp und Deletionsmutanten	93
4.2.4	Invasivität von EcN in Caco-2 Zellen.....	95
4.2.4.1	Invasionsassay mit EcN Wildtyp und Deletionsmutanten.....	96
4.2.4.2	Nachweis der Invasivität von EcN mittels Konfokalmikroskopie.....	99
4.3	<i>In vivo</i> Regulation intestinal aktiver Promotoren in EcN.....	100
4.3.1	Promotor-Reporter-Fusionsbibliothek von EcN.....	100
4.3.2	Sortierung der Promotorbank-Proben mittels Durchflusszytometrie ...	101
4.3.2.1	Promotorbank-Experimente mit konventionellen Mäusen	102
4.3.2.2	Promotorbank-Experimente mit gnotobiotischen Mäusen	104
4.3.3	Identifizierung intestinal <i>in vivo</i> regulierter Genen von EcN.....	106
4.3.4	Analyse intestinal <i>in vivo</i> aktiver Promotoren mit Feature Scan.....	109
4.3.5	Entwicklung eines Promotor-Reporter-Gen-Assays.....	110
4.3.5.1	Klonierungsstrategie für Promotor-Reporterkonstrukte	111
4.3.5.2	Etablierung des Promotor-Reporter-Gen-Assays <i>in vitro</i>	114
4.3.5.3	Aufbau des Promotor-Reporter-Gen-Assays im Mausmodell.....	119
5	Diskussion.....	122
5.1	EcN: Genomanalyse und Probiotik.....	122
5.1.1	Die Struktur des EcN-Genoms	123
5.1.2	Der Einfluss genomischer Inseln und stammspezifischer Gene auf den probiotischen Phänotyp von EcN	125
5.1.3	EcN- ein UPEC ohne zytotoxischen Effekt?	128
5.1.4	Die Rolle der stammspezifischen Plasmide von EcN.....	132

5.1.5	Genregulation in EcN durch den alternativen Sigmafaktor RpoS	133
5.2	Bedeutung intestinal <i>in vivo</i> regulierter Gene für den probiotischen Charakter von EcN	135
5.3	Forderungen an das Probiotikum <i>E. coli</i> Nissle 1917	138
6	Zusammenfassung/ Summary	140
6.1	Zusammenfassung	140
6.2	Summary	141
7	Literatur	143
8	Anhang	158
8.1	Abkürzungen	158
8.2	Oligonukleotide	160
8.3	EcN-spezifische Gene	163
8.4	Abbildungsverzeichnis	165
8.5	Tabellenverzeichnis	166
	Danksagung	167

1 Einleitung

1.1 Die intestinale Mikroflora des Menschen

Die Besiedlung des Menschen mit Mikroorganismen beginnt kurz nach der Geburt. Dabei entwickelt sich die sogenannte Normalflora an allen Oberflächen, die in Kontakt mit der Umgebung stehen. Die Haut, der obere Respirationstrakt, der Urogenitaltrakt und der Gastrointestinaltrakt beherbergen dann eine komplexe Mikroflora aus aeroben, fakultativ anaeroben und anaeroben Bakterien, aber auch Archaea, Viren und einige Pilze lassen sich nachweisen (Berg, 1996; Tancrede, 1992). Das Hauptreservoir der Bakterien ist der Gastrointestinaltrakt. Durch die unterschiedlichen Bedingungen in den einzelnen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts variiert die Verteilung der Bakterien (Abbildung 1. 1). Im Magen, Duodenum und Jejunum werden geringe Bakterienkonzentrationen mit bis zu 10^3 KbE (Kolonie bildende Einheiten) pro ml gefunden. Im Ileum steigt die Konzentration auf 10^4 - 10^8 KbE/ml an. Das Kolon beherbergt mit 10^9 - 10^{12} KbE/ml die höchste Bakterienkonzentration (Blaut und Clavel, 2007; Sartor, 2008).

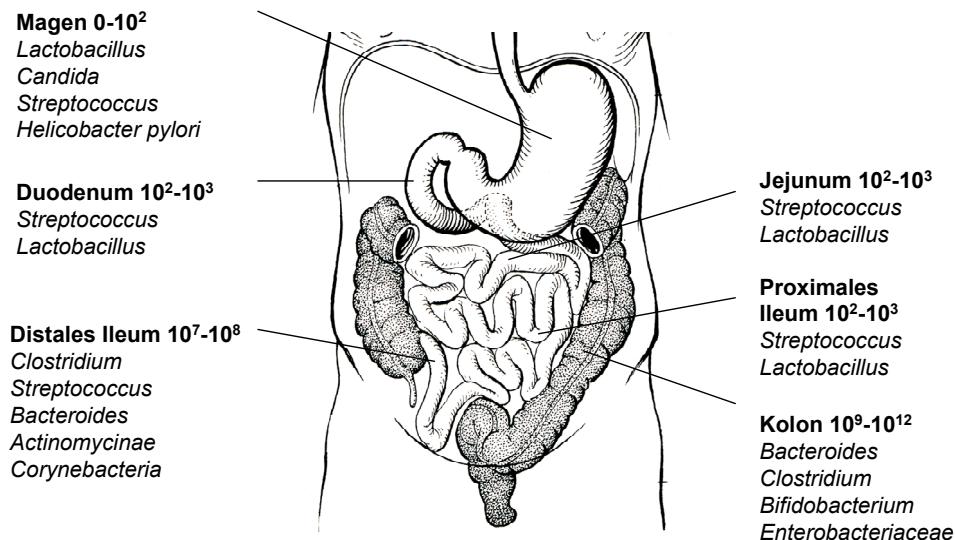


Abbildung 1. 1 Die Mikroflora des humanen Gastrointestinaltrakts

Dargestellt sind die Bakterienkonzentrationen in KbE/ml und die häufigsten bakteriellen Genera und Familiae der einzelnen Abschnitte des humanen Gastrointestinaltrakts. Modifiziert nach Sartor, 2008

Die intestinalen Bakterien bilden zusammen mit den Epithel- und Immunzellen das Ökosystem des Kolons. Die genauen Funktionen der intestinalen Mikroflora innerhalb dieses Ökosystems sind bisher nur ansatzweise bekannt. Für die normale Darmfunktion und die Gesundheit des Menschen spielt die Mikroflora jedoch eine wichtige Rolle (McCracken und Lorenz, 2001). So dient der bakterielle Metabolismus von Nahrungsbestandteilen und organischen Substraten unter anderem der Versorgung mit Vitaminen und kurzkettigen Fettsäuren wie Acetat, Propionat und Butyrat (Flint et al., 2008; Albert et al., 1980). Gleichzeitig reguliert die intestinale Mikroflora die Differenzierung und Genexpression intestinaler Zellen (Hooper et al., 2002; Hooper et al., 2001), stimuliert die Angiogenese (Stappenbeck et al., 2002) und beeinflusst die Entwicklung der humoralen und zellulären Immunantwort. Dabei wird die Immuntoleranz des Wirts einerseits durch einen physiologisch normalen Entzündungszustand im Darm gefördert (Cebra, 1999), andererseits wird durch präzise regulatorische Mechanismen eine überschießende, systemische Immunantwort verhindert, wodurch eine Homöostase zwischen Wirt und Mikroflora erreicht wird (Macpherson und Uhr, 2004; Macpherson et al., 2005; Kelly und Conway, 2005). Eine erste physikalische Barriere zwischen Wirt und Mikroflora, die die Adhäsion und Invasion der Bakterien verhindert, entsteht durch die Produktion einer Mucusschicht durch Becher- und Epithelzellen. Verstärkt wird die Barriere durch die Anreicherung antimikrobieller Peptide wie Defensine und Cathelicidine, die von Paneth-Zellen sezerniert werden (Meyer-Hoffert et al., 2008).

Die intestinale Mikroflora selbst hemmt die Kolonisierung pathogener Bakterien durch Konkurrenz um Nahrung, Raum, Rezeptoren der Wirtszellen und durch die Produktion antimikrobieller Peptide wie Bakteriozine oder anderer löslicher Faktoren. Dies wird als Antagonismus oder Kolonisierungsresistenz bezeichnet (Hudault et al., 2001; Servin, 2004; Riley und Wertz, 2002). Bakterien der Mikroflora hingegen, die durch Adhärenzfaktoren und Biofilmbildung wiederum in engem Kontakt zu den Epithelzellen stehen, erleichtern den Nährstoffaustausch und die Induktion der Wirtsimmunität (Sonnenburg et al., 2006). Im Rahmen der Co-Evolution von Mensch und Mikroflora ist also eine Symbiose in Form des Mutualismus entstanden, der für beide Partner, Bakterien und Wirt, vorteilhaft sein kann.

Gesellschaftliche Entwicklungen und die damit einhergehenden Veränderungen der Lebens- und Umweltbedingungen führen jedoch zu einer zwiespältigen Bewertung der intestinalen Mikroflora. So konnte durch Kolonisierung von Mäusen gezeigt werden, dass die intestinale Mikroflora für eine vermehrte Energiespeicherung aus Nahrung und damit für Gewichtszunahme und Adipositas verantwortlich ist (Backhed et al., 2004). Durch den bakteriellen Metabolismus entstehen kurzkettige Fettsäuren, die die Regulation der Nahrungsaufnahme des Wirts beeinflussen. Die Fettsäuren werden über Epithelzellen aufgenommen und an die Hepatozyten der Leber zur Glukoneogenese und Lipogenese weitergeleitet. Gleichzeitig wirken sie als Liganden für Rezeptoren entero-endokriner Zellen des intestinalen Epithels. Die Signale bewirken eine verminderte Darmmotilität, woraus eine verbesserte Aufnahme und Energieausbeute resultiert. Die Regulation der Energiebalance des Wirts ist also abhängig von der angesiedelten intestinalen Mikroflora (Samuel et al., 2008). Die Interaktion von Darmflora und Wirt, die im Laufe der Evolution einen Überlebensvorteil für den Menschen dargestellt hat, kann bei heutiger Lebensweise neben genetischen Faktoren zu einer vermehrten Energiespeicherung mit pathogenen Auswirkungen für den Wirt führen.

1.2 Die Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora

Die intestinale Mikroflora eines Menschen besteht nach neueren Schätzungen aus etwa 1800 bakteriellen Genera mit 15.000 bis 36.000 Spezies, von denen bisher nur wenige kultiviert oder charakterisiert wurden (Frank et al., 2007; Lievin-Le Moal und Servin, 2006). Über 99% der Bakterien gehören zu Spezies aus den vier Phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* und *Actinobacteria*. Die meisten Bakterien des Intestinaltrakts (etwa 99%) sind strikt anaerob. Fakultativ anaerobe Bakterien wie diejenigen der Genera *Escherichia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* und *Proteus* sind mit etwa 0,1% vertreten (Eckburg et al., 2005; Seksik et al., 2003). Molekulare Analysen haben gezeigt, dass die Zusammensetzung der Mikroflora abhängig von Ernährung, Alter und Erkrankungen ist und von Mensch zu Mensch signifikante Unterschiede aufweist (Eckburg et al., 2005; Moore und Moore, 1995; Hopkins et al., 2002). Aber auch innerhalb des Kolons existieren verschiedene mikrobielle Gemeinschaften, die im Lumen, an der Mucus-Schicht, an den Epithelzellen oder in den

Krypten lokalisiert sind und dort eigene Nischen besiedeln. Fakultativ anaerobe Bakterien sind z.B. in der Nähe der Epithelzellen zur Nutzung des dort vorhandenen Sauerstoffs lokalisiert (Lievin-Le Moal und Servin, 2006; Frank et al., 2007).

1.3 Kommensale und pathogene *E. coli*

Escherichia coli (*E. coli*) sind gramnegative, fakultativ anaerobe, sporenlose Stäbchen der Familie *Enterobacteriaceae*. Sie sind die vorherrschende Spezies fakultativ anaerober Bakterien der intestinalen Mikroflora. In der Regel besiedeln *E. coli* in friedlicher Co-Existenz den Intestinaltrakt von Menschen und anderen Säugetieren. Sie sind aber auch in Erde, Sediment und Wasser zu finden (Hartl und Dykhuizen, 1984). Als Indikatorkeime dienen *E. coli* zum Nachweis einer fäkalen Verschmutzung von Lebensmitteln, Trink- und Badewasser (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit: www.bvl.bund.de). Die Übertragung von kommensalen und pathogenen *E. coli* erfolgt durch orale Aufnahme von kontaminiertem Wasser oder Lebensmitteln, aber auch durch Autoinfektion oder *intra partum* von der Mutter auf das Neugeborene.

Die Bandbreite der aus humanen Stuhlproben isolierten *E. coli* reicht von harmlosen Kommensalen bis hin zu Pathogenen, die für verschiedene Erkrankungen, teilweise mit tödlichem Ausgang, verantwortlich sind. Ursache für die Pathogenität dieser *E. coli*-Stämme sind Virulenzfaktoren. Diese Virulenzmerkmale können die Anpassungsfähigkeit und damit die Eroberung neuer Nischen fördern und gleichzeitig die Ursache für ein breites Spektrum an Krankheiten sein (Kaper et al., 2004). Zu den Virulenzmerkmalen gehören z.B. die Expression von Toxinen (Shiga-Toxin, Enterotoxin, Hämolysin, Invasin), die Kapselbildung und die Expression von Adhäsinen wie Pili, Fimbrien und Kolonisierungsfaktoren.

Abhängig vom Ort der Manifestation wird zwischen intestinal pathogenen *E. coli* (IPEC) und extraintestinal pathogenen *E. coli* (ExPEC) unterschieden. IPEC verursachen schwere Diarrhö, während ExPEC häufig Bestandteil der Normalflora sind. Sie verhalten sich unauffällig bis sie ihr normales Habitat verlassen und dann zu Erregern von Harnwegsinfekten, Sepsis und Neugeborenen-Meningitis werden (Johnson, 1991).

Die verschiedenen *E. coli*-Pathotypen mit ihren charakteristischen Virulenzfaktoren sind in Tabelle 1. 1 aufgeführt.

Tabelle 1. 1 Intestinale und extraintestinale Pathotypen von *E. coli*

Pathotyp	Art der Infektion	Charakteristische Virulenzfaktoren
Enterohämorrhagische <i>E. coli</i> (EHEC)	Hämorrhagische Colitis, Hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS)	Stx, LEE, Hly
Enterotoxische <i>E. coli</i> (ETEC)	Cholera-ähnliche Diarrhö	LT, ST, CF
Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)	Ruhr-ähnliche Diarrhö	Ial, ET
Enteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC)	Säuglingsenteritis, wässrige Diarrhö	LEE, Intimin
Enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAEC)	Chronische Diarrhö bei Kindern	AAF, EAST1
Diffus adhärierende <i>E. coli</i> (DAEC)	Diarrhö	AIDA-I oder Afa/Dr
Uropathogene <i>E. coli</i> (UPEC)	Harnwegsinfekt	Hly, CNF1, Fimbrien
Meningitis verursachende <i>E. coli</i> (MENEC)	Meningitis	Fimbrien, Invasin, CNF1, K1
Sepsis verursachende <i>E. coli</i> (SEPEC)	Sepsis	Adäsine, ETT2
Adhärenz-invasive <i>E. coli</i> (AIEC)	Kolonisierung der Mucosa bei Morbus Crohn-Patienten	Unbekannt
Vogelpathogene <i>E. coli</i> (APEC)	Infektion des Respirationstraktes, Sepsis bei Geflügel	Adhäsine, Hly, Ha

Stx Shigatoxin; LEE locus of enterocyte effacement; Hly α -Hämolysin, LT hitzelabiles Toxin; ST hitzestabiles Toxin; CF Kolonisierungsfaktor; Ial Invasions-assoziiierter Locus; ET Enteroinvasives Enterotoxin; AAF aggregative Adhärenz; EAST1 EAEC-hitzeabiles Enterotoxin; AIDA-I Adhäsine involviert in diffuse Adhärenz; Afa/Dr DAEC-afimbrielles Adhäsine; CNF1 zytotoxisch-nekrotisierender Faktor 1; K1 Kapsel des Serotyps K1; ETT2 *E. coli* Typ III Sekretionssystem 2; Ha Hämagglutinin

Uropathogene *E. coli* (UPEC) aus der Gruppe der ExPEC-Stämme gehören zu den häufigsten Erregern akuter und chronischer Harnwegsinfekte. Sie bilden eine geno- und phänotypisch heterogene Gruppe mit einer beschränkten Anzahl an Serogruppen (O1, O2, O4, O6, O7 und O75). Die Virulenzfaktoren sind häufig auf Pathogenitätsinseln lokalisiert (Brzuszkiewicz et al., 2006; Hacker et al., 2003; Dobrindt et al., 2004). Als

typische Virulenzfaktoren werden P-, S-, F1C- und Typ1-Fimbrien, Toxine wie Hämolysin und der zytotoxisch-nekrotisierender Faktor CNF1, Adhäsine und Eisenaufnahmesysteme beschrieben. Die Polysaccharidkapsel und LPS sind ebenfalls an der Pathogenese beteiligt (Bekal et al., 2003; Ewers et al., 2007; Moreno et al., 2005; Restieri et al., 2007; Abe et al., 2008; Wiles et al., 2008). Die Virulenzfaktoren sind jedoch nicht in allen UPEC-Stämmen vorhanden, sodass anstelle eines UPEC-spezifischen Mechanismus verschiedene Virulenzmechanismen zur Ausprägung der Erkrankungen existieren müssen (Lloyd et al., 2007; Marrs et al., 2002). Dies zeigt auch der Genomvergleich der zwei Pyelonephritis-Isolate *E. coli* CFT073 und *E. coli* 536 hinsichtlich ihrer Virulenzmerkmale. Beide gehören der Serogruppe O6 an (Welch et al., 2002; Brzuszkiewicz et al., 2006). Diese Serogruppe umfasst interessanterweise neben UPEC auch IPEC und Kommensale (Blum et al., 1995b).

1.4 Genomorganisation und Genregulation bei *E. coli*

1.4.1 Dynamik der Bakteriengenome

Die genetische Variabilität, wie sie bei *E. coli* durch die unterschiedlichen kommensalen und pathogenen Stämme dargestellt ist, wird durch verschiedene Mechanismen erzeugt. Punktmutationen und Rekombinationsereignisse führen zur Modifikation, Inaktivierung und veränderter Regulation von Genen. Auch die als horizontaler Gentransfer (HGT) bezeichnete Übertragung genetischen Materials innerhalb einer Spezies oder auch zwischen zwei Gattungen spielt eine wichtige Rolle bei der Veränderung der Genomstruktur (Ochman et al., 2000). Die horizontal erworbenen DNA-Fragmente sind meistens Bakteriophagen, Plasmide, Transposons, Integrons und genomische Inseln bzw. Pathogenitätsinseln. Sie bilden den flexiblen Genpool des Genoms und enthalten häufig Virulenzfaktoren, Antibiotikaresistenzgene, Eisenaufnahmesysteme und andere Gene oder Gencluster, welche die Anpassungsfähigkeit eines Stamms auf eine veränderte Umgebung beeinflussen können (Ochman et al., 2000; Dobrindt et al., 2003; Hacker und Kaper, 2000). Inaktivierte Gene oder nicht-funktionelle Regionen dagegen werden durch weitere Mutationen eliminiert. Dadurch enthalten die Bakteriengenome eine hohe Dichte funktioneller Gene und weisen eine hohe Dynamik im Genom auf (Ochman und Davalos, 2006; Ochman und Jones, 2000).

Im Gegensatz zum flexiblen Genpool beinhaltet das Kerngenom grundlegende genetische Informationen, welche zum Wachstum, zur Zellteilung und für den Stoffwechsel benötigt werden (Hacker und Carniel, 2001).

1.4.2 Bakterielle Genregulation durch Promotoren

Nur ein Teil der Gene des *E. coli*-Genoms wird kontinuierlich transkribiert. Diese konstitutiv exprimierten Gene kodieren im Allgemeinen Enzyme, die in etwa gleichbleibender Menge für Ernährung und Wachstum der Zellen synthetisiert werden. Die meisten Gene unterliegen jedoch der transkriptionellen, translationalen und post-translationalen Regulation. Bei der Regulation der Transkription spielen Promotoren eine Schlüsselrolle. Abhängig von Umwelteinflüssen werden verschiedene Sigma-Faktoren wie RpoD, RpoH, RpoN, RpoS oder FlaI zur Erkennung der Promotorsequenz verwendet. Sigma-Faktoren sind Untereinheiten der RNA-Polymerase und unterliegen wiederum, wie auch der Promotor selbst, unterschiedlichen Regulationsmechanismen (Madigan et al., 2001). Die RNA-Polymerase produziert polycistronische oder monocistronische mRNA-Transkripte. Für den Laborstamm *E. coli* K-12 wurde berechnet, dass die rund 4400 kodierenden Sequenzen in 2500-2800 Transkriptionseinheiten exprimiert werden. Von diesen sind etwa 75% monocistronisch. Das bedeutet, dass über die Hälfte aller Gene in Operons (polycistronisch) abgelesen werden (Dryselius et al., 2006).

All diese Faktoren der Genomorganisation und der Genregulation sorgen für eine enorme Variabilität in der Genomgröße, im Genrepertoire und in der Genregulation, die für die Ausprägung der unterschiedlichen Phänotypen bei *E. coli* verantwortlich sind (1.3 und Tabelle 1. 1).

1.5 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) sind die Hauptvertreter der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Sie sind rezidivierend verlaufende, destruierende Entzündungen des Intestinaltrakts mit heterogener Ausprägung. Typischerweise äußern sich die Ausbrüche mit schwerer, blutiger Diarrhö, abdominalen Schmerzen und Mangelernährung.

MC und CU unterscheiden sich durch die Lokalisation und Ausprägung der Entzündung. Bei MC sind meist Ileum und Kolon betroffen, es kann jedoch auch der gesamte Gastrointestinaltrakt involviert sein. Die Entzündungen sind transmural und diskontinuierlich, häufig bilden sich Granulome. Komplikationen entstehen durch Fistelbildung, Stenosen, Fissuren und Abszesse, die chirurgisch behandelt werden müssen. Die entzündlichen Veränderungen bei CU dagegen breiten sich kontinuierlich an der Mukosa und der Submukosa der Darmwand aus. Sie treten im Kolon und Rektum auf und können sich in einigen Fällen bis zum Zäkum fortsetzen. Komplikationen ergeben sich durch schwere Blutungen, die Ausbildung eines toxischen Megakolons und refraktäre CU. Bei etwa 20% der Patienten mit refraktärer CU erfolgt dann eine Kolektomie mit Anlage eines ileoanalen Pouch oder eines Stoma.

Häufig treten CED bei Menschen zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auf. In Deutschland sind etwa 300.000 bis 500.000 Menschen davon betroffen (Cho, 2008); www.gesundheitsforschung-bmbf.de). Die Ätiologie von MC und CU ist noch unklar. Es gibt zunehmend Hinweise, dass Bakterien und ihre Komponenten eine Rolle in der Pathogenese der CED spielen (D'Haens et al., 1998; Tamboli et al., 2004). So lassen sich bei Patienten mit MC häufig adärent-invasive *E. coli* (AIEC, Tabelle 1. 1) nachweisen, die zum Teil in hoher Dichte in ilealen Läsionen zu finden sind (Darfeuille-Michaud et al., 2004; Boudeau et al., 1999). AIEC gelten aufgrund der Fähigkeit zur Adhärenz an intestinale Epithelzellen und aufgrund ihres invasiven Potenzials als potentielle Pathogene, die in der Lage sind, eine persistierende intestinale Entzündung hervorzurufen (Darfeuille-Michaud, 2002; Eaves-Pyles et al., 2008). Für beide CED wird jedoch das Zusammenspiel genetischer Faktoren, Umweltfaktoren, immunologischer Dysregulation und der intestinalen Mikroflora als Basis der Pathogenese angenommen (Abbildung 1. 2; (Kucharzik et al., 2006; Hibi und Ogata, 2006).

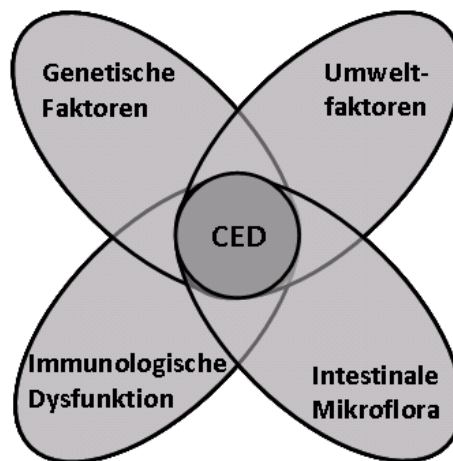


Abbildung 1. 2 Zusammenspiel verschiedener Faktoren in der CED-Pathogenese

Das Schema zeigt die vier grundlegenden Faktoren, die in die Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (CED) involviert sind. Modifiziert nach Hibi und Ogata, 2006; Kucharzik et al., 2006

Die wichtigsten Behandlungsziele bei CED-Patienten sind die Induktion und die Erhaltung der Remission mit endoskopisch gesicherter Heilung. Zur Behandlung von CED werden verschiedene Medikamente eingesetzt, unter anderem Aminosalicylate, Immunsuppressiva (Glukokortikoide und Azathioprin), der zytostatisch wirksame Folsäure-Antagonist Methotrexat und Biologica wie z.B. anti-TNF α -Antikörper (www.dccv.de). Der Einsatz insbesondere von Steroiden, aber auch die Hospitalisierung und chirurgische Eingriffe sollten möglichst sparsam erfolgen (Sandborn, 2008); Probleme in der Standardtherapie treten durch die hohe Rezidivrate (etwa 50% der Patienten) und bei steroidabhängigen und refraktären Patienten auf. Die nicht mehr adäquat behandelbare Erkrankung sowie die Nebenwirkungen der Steroide und anderer Medikamente erfordern neue Therapiekonzepte. Die Verwendung von Probiotika spielt als nebenwirkungsarme und gut verträgliche Alternative zur Standardmedikation inzwischen eine wichtige Rolle. Die Wirksamkeit ausgewählter Probiotika-Stämme in der Prophylaxe und Therapie von CED und anderen Erkrankungen ist durch prospektive, kontrollierte Studien zumindest teilweise belegt (Bischoff und Manns, 2005).

1.6 Probiotika

1.6.1 Geschichte der Probiotika

Schon 76 vor Christus empfahl der römische Historiker Plinius die Einnahme von fermentierten Milchprodukten zur Behandlung einer Gastroenteritis (Schrezenmeir und de Vrese, 2001). Erste wissenschaftliche Untersuchungen zur Nutzung von Mikroorganismen für die Modulation der Darmflora gibt es erst seit etwa 100 Jahren. Der russische Bakteriologe Elie Metchnikoff vertrat die Meinung, dass der Verzehr von Laktobazillen aus fermentierter Milch die Toxin produzierenden Bakterien im Darm reduziert. Das Ersetzen der gesundheitsschädlichen Darmbakterien mit nützlichen Bakterien sollte die Lebenserwartung verbessern (Metchnikoff, 1907). Etwa zur gleichen Zeit empfahl der französische Kinderarzt Henry Tissier, Bifidobakterien an Säuglinge mit Diarrhö zu verabreichen, um die pathogenen Bakterien der intestinalen Flora zu verdrängen. Er hatte beobachtet, dass Säuglinge, die an Diarrhö litten, weniger Bifidobakterien in der Stuhlflora aufwiesen als gesunde, gestillte Säuglinge. Erste Hinweise für eine positive Wirkung von Fäkalbakterien auf die Darmflora beschrieb im Jahre 1916 der Arzt Alfred Nissle (Schrezenmeir und de Vrese, 2001).

1.6.2 Definition eines Probiotikums

Der Begriff „Probiotikum“ wurde erst 1965 von Lilly und Stillwell eingeführt. Sie bezeichneten damit Substanzen, die von Mikroorganismen sezerniert werden und das Wachstum anderer Mikroorganismen fördern, was den Gegensatz zum Antibiotikum verdeutlichen sollte (Lilly und Stillwell, 1965). Im Laufe der Jahre wurde der Name mehrfach wieder aufgegriffen und erhielt eine zunehmend allgemeinere Bedeutung (Schrezenmeir und de Vrese, 2001).

Probiotika werden heute definiert als lebende Mikroorganismen, die bei Verabreichung einer adäquaten Menge eine gesundheitsfördernde Wirkung auf den Wirt haben (Guarner und Schaafsma, 1998; Araya et al., 2002). Als Probiotika werden hauptsächlich *Lactobacilli* und *Bifidobacteria*, aber auch andere Mikroorganismen wie *E. coli* Nissle 1917, *Enterococcus faecium* und *Saccharomyces boulardii* verwendet (Tabelle 1. 2).

Tabelle 1. 2 Probiotische Mikroorganismen

<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Bifidobacterium spp.</i>	Andere
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Sacharomyces boulardii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Enterococcus faecium</i> *
<i>L. fermentum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> **
<i>L. gasseri</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Escherichia coli</i> M-17***
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. longum</i>	
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		

*Potentielle Pathogenität und Vancomycinresistenz

**Effektivität als Probiotikum nur im Zusammenhang mit spezifischen Antibiotika und nicht mit entzündungshemmenden Medikamenten und Spermiziden (Todorov et al., 2007)

*** (Adler, 2006; Fitzpatrick et al., 2008)

modifiziert nach (Senok et al., 2005)

Für die Verwendung von Probiotika z.B. in Lebensmitteln oder als Therapeutikum gelten strenge Richtlinien. Sie müssen folgende Kriterien bezüglich ihrer Merkmale und Sicherheit erfüllen (Fric, 2002; Araya et al., 2002):

1. Humaner Ursprung
2. Molekulargenetische, serologische, mikrobiologische und biochemische Typisierung
3. Ausschluss von Pathogenitätsfaktoren (Entero- und Zytotoxine, Enteroinvasivität, pathogene Adhärenzaktivität, Hämolyse, Serumresistenz und antibiotische Resistenz)
4. Applikation als lebende Kultur
5. Resistenz gegenüber Magensäure, Galle und Spermiziden
6. Fähigkeit zur Adhärenz an Kolon-Epithelzellen
7. Fähigkeit zur Kolonisierung im Darm
8. Antimikrobielle Aktivität gegenüber pathogenen Bakterien
9. Fähigkeit zur Reduktion der Adhärenz pathogener Bakterien
9. Klinisch bewiesener gesundheitsfördernder Effekt
10. Sicherheit bezüglich systemischer Infektionen, schädlicher metabolischer Aktivität, exzessiver Immunstimulation und Gentransfer

Diese Kriterien werden bisher nicht von allen in Tabelle 1. 2 aufgeführten Probiotika erfüllt. Beispielsweise ist die probiotische Hefe *Saccharomyces boulardii* nicht humanen Ursprungs, und der probiotische Stamm *Enterococcus faecium* ist häufig die Ursache nosokomialer Infektionen und zeigt zunehmend Vancomycinresistenz. Dennoch werden *Saccharomyces*-Präparate neben Präparationen einiger anderer Mikroorganismen als Probiotika erfolgreich eingesetzt (Araya et al., 2002; Fric, 2002). Die Testung der Mikroorganismen auf potentiell probiotische Eigenschaften erfolgt zunächst durch Experimente *in vitro*. Anschließende Untersuchungen *in vivo* sollen als doppelblinde, randomisierte, Placebo-kontrollierte Studien durchgeführt werden, die durch ihr Studiendesign belegen, ob ein Stamm oder ein mikrobielles Produkt tatsächlich wirksam ist (Araya et al., 2002).

1.6.3 Probiotika als therapeutische Alternativen

In den letzten Jahren wurden verschiedene Studien zur Verwendung von Probiotika veröffentlicht, die deren Einfluss auf die Behandlung unterschiedlicher Erkrankungen zeigen. Dazu gehören die Prävention und zeitliche Reduktion von Diarrhö bei Kindern, die durch Rotaviren oder Antibiotikatherapie induziert ist, die Linderung der Symptome bei Lactose-Intoleranz, die Reduktion der Konzentration kanzerogener Enzyme und bakterieller Fäulnismetaboliten im Darm sowie die Verbesserung unspezifischer gastro-intestinaler Beschwerden, Obstipation und Reizdarmbeschwerden (de Vrese und Schrezenmeir, 2008). Die Behandlung von MC und CU zeigt teilweise vielversprechende Ergebnisse (Tabelle 1. 4). Neuere Studien belegen außerdem eine Verbesserung der Eradikationsrate bei *Helicobacter pylori*-Infektionen durch die zusätzliche Gabe von Probiotika (Tong et al., 2007). Außerdem wurde festgestellt, dass die Behandlung von Frühgeborenen mit Probiotika die Entwicklung einer nekrotisierenden Enterocolitis verhindert und damit die Sterblichkeit gesenkt werden kann (Deshpande et al., 2007). Des Weiteren werden Probiotika zur Prävention oder Linderung von Allergien und atopischen Erkrankungen bei Kindern, zur Prävention von Infektionen des Respirationstraktes und zur Behandlung von Infektionen im Urogenitaltrakt eingesetzt (de Vrese und Schrezenmeir, 2008). Wie die Vielzahl der unterschiedlichen Anwendungsgebiete zeigt, ist der Einsatz von Probiotika durch die einfache und in der Regel nebenwirkungsarme Applikation eine attraktive Alternative zu herkömmlichen Behandlungsmethoden.

1.6.4 Der probiotische Effekt

Viele Wirkmechanismen probiotischer Stämme sind trotz der klinisch erwiesenen therapeutischen Wirkung weitgehend unbekannt. Die bisher ermittelten grundlegenden Eigenschaften probiotischer Bakterien bestehen in der direkten Wechselwirkung mit der intestinalen Mikroflora des Wirts und in der Fähigkeit zur direkten oder über die Mikroflora vermittelten Interaktion mit dem Immunsystem (Abbildung 1. 3). Die Wirkmechanismen einzelner Spezies können dabei sehr unterschiedlich sein und sind Gegenstand intensiver Forschung (Sartor, 2005).

Ein wichtiger Effekt probiotischer Aktivität ist die Inhibition pathogener Bakterien durch die probiotischen Mikroorganismen. Diese sezernieren antibakterielle Substanzen wie Bakteriozine und Mikrozine. Sensible Bakterien nehmen diese Peptide auf. Die antimikrobielle Wirkung entsteht durch Porenbildung in der Zytoplasmamembran, Hemmung der Aktivität essentieller Enzyme oder unspezifische Degradation der DNA der sensiblen Bakterien (Riley und Wertz, 2002). Zusätzlich senkt die Produktion von Acetat, Lactat und Propionat durch Lactobazillen den pH-Wert im Darmlumen ab und hemmt so das Wachstum Gram-negativer Bakterien (Makras et al., 2006). Mehrfach konnte gezeigt werden, dass Adhärenz und Invasion pathogener Bakterien reduziert werden (Boudeau et al., 2003; Resta-Lenert und Barrett, 2003; Candela et al., 2005). Die Reduktion der Adhärenz ist zumindest für *Lactobacilli* und *Bifidobacteria* auf die Blockierung der Rezeptoren von Epithelzellen zurückzuführen (Mukai et al., 2004; Sun et al., 2007).

Ein weiterer Mechanismus probiotischer Bakterien ist die Modulation der intestinalen Barrierefunktion. Probiotika induzieren die Produktion von antimikrobiellen und immunstimulatorischen Defensinen durch intestinale Epithelzellen und Panethzellen. Die Defensinproduktion ist bei Patienten mit MC vermindert und stellt somit einen Faktor dar, der möglicherweise zur Ausprägung der Krankheit beiträgt (Schlee et al., 2007; Schlee et al., 2008; Wehkamp et al., 2005). Die gesteigerte Expression von Muzinen wird insbesondere durch *Lactobacilli* hervorgerufen (Mack et al., 2003; Caballero-Franco et al., 2007). Sowohl in Mausmodellen als auch *in vitro* konnte nachgewiesen werden, dass Probiotika die Barrierefunktion durch vermehrte Expression der Tight junction-Proteine ZO-1 und ZO-2 und der Proteinkinase C (PKC ξ) verbessern (Ukena et al., 2007; Zyrek et al., 2007; Madsen et al., 2001). Die Tight junction-

Proteine bilden die basolaterale Verbindung zwischen benachbarten Enterozyten. Die Proteinkinase C wirkt als Regulator der ZO-Proteine.

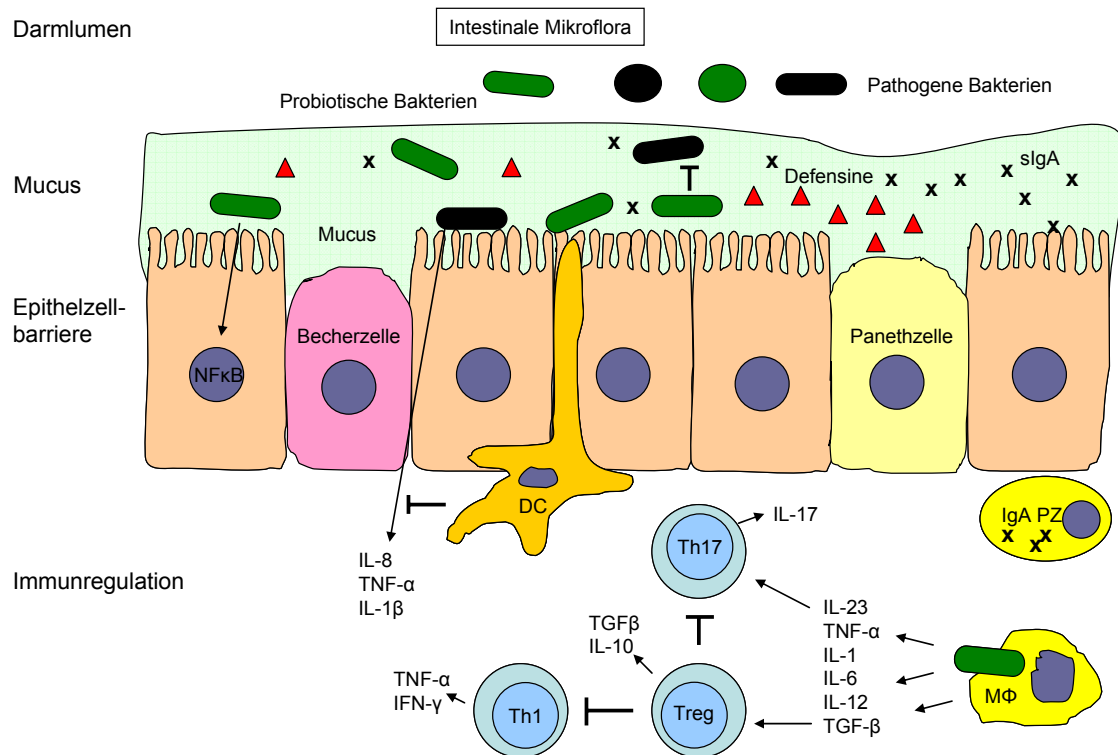


Abbildung 1.3 Wirkungen probiotischer Bakterien auf den Wirt

Probiotika regulieren die Homöostase ihres Wirts. Die bekannten Wirkmechanismen, die hier an intestinalen Epithelzellen dargestellt sind, umfassen die Modulation der intestinalen Mikroflora durch Inhibition der Kolonisierung, Adhärenz und Invasion pathogener Bakterien, die Modulation des Immunsystems durch Induktion der antiinflammatorischen Zytokinproduktion und Inhibition der proinflammatorischen Zytokinproduktion, die Modulation der intestinalen Barrierefunktion durch Sekretion von Muzinen, Defensinen und IgA und Verminderung der mukosalen Permeabilität gegenüber luminalen Substanzen. Es sind nur einige der Zytokine aufgeführt, die für die immunologischen Mechanismen eine Rolle spielen. Modifiziert nach Sollid und Johansen, 2008

DC Dendritische Zelle; IL Interleukin;; MΦ Makrophage; PZ Plasmazelle; sIgA lösliches IgA; Treg regulatorische T-Zelle; Th T-Helferzelle

Die Wirkung der Probiotika auf das intestinale Immunsystem führt zu einer Modulation der Immunantwort. Dabei wird ein Gleichgewicht zwischen benötigter und überschießender Immunreaktion hergestellt. Bakterien werden in der Regel durch Toll-like Rezeptoren (TLRs) der verschiedenen Zellen des Darms erkannt und lösen eine Signalkaskade aus. Die durch Probiotika induzierte Immunantwort unterscheidet sich dabei von einer durch Pathogene ausgelöste Immunantwort. Wahrscheinlich

interagieren probiotische Bakterien mit den TLRs der polarisierten intestinalen Epithelzellen und hemmen hier die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B und somit die nachfolgende proinflammatorische Signalkaskade, wie sie für basale Zellschichten beschrieben wurde (Lee et al., 2006). Zusätzlich scheinen probiotische Bakterien Zellkomponenten zu besitzen, die die veränderte Aktivierung der TLRs induzieren (Hajjar et al., 2002). Außerdem besitzen Probiotika die Fähigkeit, Oberflächenmoleküle in dendritischen Zellen (DC) zu verändern und die Zytokinausschüttung der nachfolgend stimulierten Zellen zu beeinflussen, so dass eine verminderte Expression proinflammatorischer Zytokine und die Produktion antiinflammatorischer Zytokine nachgewiesen werden kann (Drakes et al., 2004; Foligne et al., 2007; Vanderpool et al., 2008). Die Wirkmechanismen probiotischer Bakterien sind in Tabelle 1. 3 zusammengefasst.

Tabelle 1. 3 Wirkmechanismen probiotischer Bakterien

Modulation der intestinalen Mikroflora

Inhibition pathogener Bakterien

Absenken des luminalen pH-Werts durch Produktion von Säuren

Produktion antimikrobieller Peptide (Mikrozine, Bakteriozine)

Inhibition von Adhärenz und Invasion pathogener Bakterien

Besetzung ökologischer Nischen (Kolonisierungsresistenz)

Modulation des Immunsystems

Vermehrte Expression antiinflammatorischer Zytokine (IL-10, TGF- β)

Stimulation der Produktion von sekretorischem IgA

Verminderte Expression proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-12)

Aktivierung von dendritischen Zellen, regulatorischen T-Zellen, Th1-Zellen und Granulozyten

Regulation der TLR-aktivierten Signalkaskaden

Modulation der intestinalen Barrierefunktion

Produktion von Defensinen durch intestinale Epithelzellen und Paneth-Zellen

Produktion und Sekretion von Muzinen

Verbesserung der mukosalen Permeabilität durch Überexpression von ZO-1, ZO-2, PKC ξ

IL Interleukin, TGF- β Transforming growth factor beta, Ig Immunglobulin, TNF- α Tumornekrosefaktor alpha, IFN- γ Interferon γ , Th1 T-Helferzellen Typ 1, TLR Toll-like Receptor, ZO Zonula occludens Protein, PKC Proteinkinase C, modifiziert nach (Sartor, 2005)

1.7 Der probiotische Stamm *Escherichia coli* Nissle 1917

1.7.1 Vom Stuhlisolat zum Probiotikum

Der Stamm *E. coli* Nissle 1917 (EcN) wurde während des 1. Weltkriegs von dem Freiburger Arzt und Mikrobiologen Alfred Nissle (1874-1965) aus den Faeces eines Soldaten isoliert, der im Gegensatz zu seinen Kameraden nicht an der Enteritis-Epidemie litt, die zu der Zeit in seinem Stationierungsgebiet auf dem Balkan grassierte. Fallstudien und Experimente, welche die deutlich antagonistische Wirkung von EcN gegenüber dem schon damals bekannten Typhus-Erreger *Salmonella typhi* zeigten, überzeugten Alfred Nissle von der therapeutischen Eignung antagonistisch aktiver *E. coli*-Stämme für die Behandlung gastrointestinaler Erkrankungen. Er ließ sich Ende 1916 die Handelsmarke Mutaflor® beim Reichspatentamt in Berlin schützen (Nissle, 1918). Unter diesem Namen werden seit etwa 1917 Präparate auf der Grundlage des Stamms EcN vertrieben. Mit der Entdeckung und Entwicklung der Antibiotika in den 1940er Jahren geriet EcN in Vergessenheit. Erst in den letzten Jahren wurde das Interesse an diesem Stamm wieder geweckt. In kontrollierten Studien konnte gezeigt werden, dass die Remissionserhaltung bei Colitis ulcerosa mit EcN genau so effektiv wie die Behandlung mit dem Standardmedikament Mesalazin ist (Kruis et al., 1997; Rembacken et al., 1999; Kruis et al., 2004). Neuere Studien zeigen darüber hinaus die Wirksamkeit von EcN bei der Behandlung sowohl von Diarrhö bei Kindern als auch von Pouchitis und Reizdarmsyndrom. Weitere Anwendungsgebiete von EcN sind chronische Obstipation, Dyspepsie, Gastroenteritis, Vorbeugung von Infektionen mit *C. albicans* oder *C. difficile* nach Antibiotikatherapie, Reisediarrhö und die Kolonisationsprophylaxe und Verbesserung der Immunkompetenz bei Neugeborenen, (Kruis, 2001; Malchow, 1997; Mollenbrink und Bruckschen, 1994; Segarra-Newnham, 2007; Lodínová-Zádníková und Sonnenborn, 1997; Cukrowska et al., 2002; Lodínová-Zádníková et al., 2003). Viele der Behandlungserfolge sind auf eine Normalisierung der Darmflora nach der Therapie mit EcN zurückzuführen. Einen Überblick über bisher veröffentlichte Studien mit EcN gibt Tabelle 1. 4.

Tabelle 1. 4 Klinische Studien mit *E. coli* Nissle 1917

Studie (Referenz)	Erkrankung	Art der Studie	Ergebnis
McCann ML 1994 (McCann et al., 1994)	CU, MC	Fallstudie mit 5 Erwachsenen und 3 Kindern	Remissionserhaltung möglich
Malchow 1997 (Malchow, 1997)	MC	Randomisierte kontrollierte Pilotstudie mit 28 Erwachsenen	Remissionserhaltung bei MC nach Steroidtherapie möglich
Kruis 1997 (Kruis et al., 1997)	CU	Randomisierte kontrollierte Studie mit 120 Erwachsenen	Remissionserhaltung bei CU vergleichbar mit Mesalazin
Rembacken 1999 (Rembacken et al., 1999)	CU	Randomisierte kontrollierte Studie mit 120 Erwachsenen	Remissionserhaltung bei CU unter Steroidtherapie vergleichbar mit Mesalazin
Kuzela 2001 (Kuzela et al., 2001)	Pouchitis	Fallstudie mit 2 Erwachsenen	Therapie bei Pouchitis möglich
Kruis 2004 (Kruis et al., 2004)	CU	Randomisierte kontrollierte Studie mit 327 Erwachsenen	Remissionserhaltung bei CU vergleichbar mit Mesalazin
Krammer 2006 (Krammer et al., 2006)	Gastrointestinale Beschwerden, CU, MC, Reizdarmsyndrom, chron. Obstipation	Prospektive Datenerhebung, Anwendungsbeobachtung mit 3807 Patienten	Gute Verträglichkeit bei verschiedenen gastro-intestinalen Beschwerden mit Verbesserung der Symptome
Henker 2007 (Henker et al., 2007)	Akute Diarrhö bei Kleinkindern	Randomisierte kontrollierte Studie mit 113 Kleinkindern	Verkürzte Dauer akuter Diarrhö bei Kleinkindern
Plassmann 2007 (Plassmann und Schulte-Witte, 2007)	Reizdarmsyndrom	Retrospektive Evaluation mit 150 Patienten	Verbesserung der Symptome
Henker 2008 (Henker et al., 2008a)	Diarrhö bei Kleinkindern	Randomisierte kontrollierte Studie mit 151 Kleinkindern	Verkürzte Dauer einer Diarrhö bei Kleinkindern
Henker 2008 (Henker et al., 2008b)	CU bei Kindern und Jugendlichen	Pilotstudie mit 34 Kindern und Jugendlichen	Remissionserhaltung bei CU auch bei Kindern möglich

CU Colitis ulcerosa; MC Morbus Crohn

Die Wirksamkeit von EcN wie auch von anderen Probiotika konnte in einigen randomisierten, Placebo-kontrollierten klinischen Studien belegt werden. Andere Studien geben aufgrund des Studiendesigns und der Patientenzahl nur Hinweise auf einen möglichen therapeutischen Effekt der eingesetzten Probiotika. Die Durchführung von Langzeitstudien mit größeren Patientenzahlen und standardisierter Methodik sowie Studien zur Dosis-Abhängigkeit und zur Bestätigung der therapeutischen Wirkung sind deshalb wichtig für die Verbesserung der Therapieansätze (Hedin et al., 2007). Die Kenntnisse der Wirkmechanismen sowohl auf der Seite des Wirts als auch auf der Seite von EcN können hilfreich für den Aufbau dieser Studien sein und den gezielten Einsatz von EcN und anderen Mikroorganismen als Probiotika verbessern.

1.7.2 Stammcharakteristika von EcN

Seit etwa 20 Jahren wird intensiv daran gearbeitet, die molekularen Grundlagen der probiotischen Wirkung von EcN zu entschlüsseln. In den vergangenen Jahren konnten zahlreiche stammspezifische Charakteristika wie strukturelle Merkmale und Synthesleistungen identifiziert werden (Abbildung 1. 4).

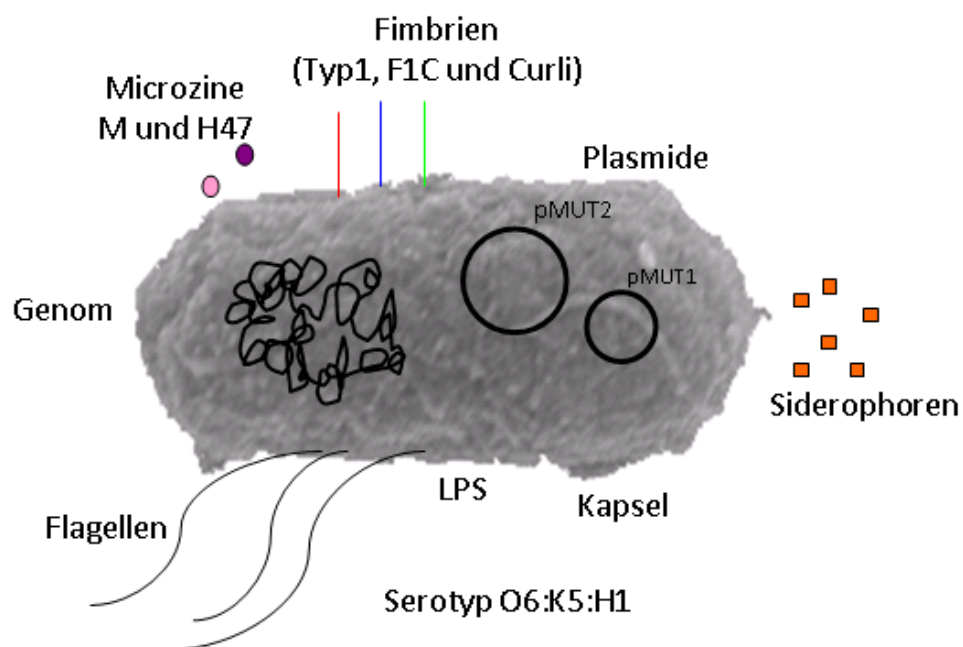


Abbildung 1. 4 Strukturkomponenten und Fitnessfaktoren von EcN

Dargestellt sind die wichtigsten Strukturkomponenten des Stamms. Flagellen, Fimbrien und LPS haben signalvermittelnde Wirkung auf den Wirt. Das Genom hat eine Länge von 5,05 Mb. Die Plasmide pMUT1 und pMUT2 haben eine Größe von 3,1 kb und 5,5 kb. LPS: Lipopolysaccharid.

Die genetischen Informationen sind im EcN-Genom der Größe von 5,05 Mb (Sun et al., 2005) und den zwei kryptischen Plasmiden pMUT1 und pMUT2 der Größe 3,1 kb und 5,5 kb kodiert. Die Plasmide, die spezifisch für EcN sind, werden zur molekularen Identifizierung des Stamms herangezogen (Blum-Oehler et al., 2003).

Der Serotyp des Stamms ist O6:K5:H1. Die verkürzte O-spezifische Seitenkette des LPS ist für die Serumsensitivität und die semirauhe Kolonieform des Stammes verantwortlich (Blum et al., 1995b; Grozdanov et al., 2002). Flagellen des Serotyps H1 bewirken die Beweglichkeit der Bakterien, sodass diese nach der Magen-Darm-Passage die Epithelzellen des Kolons erreichen können. Die Adhärenz an Epithelzellen und die Bildung von Biofilmen wird durch die drei beschriebenen Fimbrientypen Typ1, F1C und Curli erreicht. Die von virulenten *E. coli*-Stämmen bekannten P- und S-Fimbrien werden jedoch nicht exprimiert (Blum et al., 1995b; Grozdanov et al., 2004; Lasaro et al., 2008).

EcN sezerniert die Mikroazine M und H47. Diese antimikrobiellen Peptide wirken auf sensible Bakterien wachstumshemmend (Patzner et al., 2003). Unabhängig von den Mikrozininen setzt EcN die Invasionsfähigkeit enteroinvasiver Bakterien wie Salmonellen, Shigellen, Yersinien und Listerien herab und vermindert auch die Adhäsionsfähigkeit pathogener Bakterien (Altenhoefer et al., 2004; Boudeau et al., 2003; Kleta et al., 2006). Auch die Produktion von Shiga-Toxinen enterohämorrhagischer *E. coli* wird durch EcN inhibiert (Reissbrodt et al., 2009). EcN konkurriert erfolgreich mit anderen Mikroorganismen und insbesondere pathogenen Bakterien um Nährstoffe und Vermehrung und sorgt so für die positive Modulation der intestinalen Mikroflora. Weitere Eigenschaften, die als Fitness-Faktoren bezeichnet werden, vermitteln ebenfalls Wachstums- und Kolonisierungsvorteile, die in der Konkurrenz um Raum, Nahrung und Nischen im Darm eine wichtige Rolle spielen können. Zu den Fitness-Faktoren gehören unter anderem die Eisenaufnahmesysteme Aerobactin, Enterobactin, Eisendicitratsystem, Salmochelin, Yersiniabactin und das Häm-Transportsystem (Grozdanov et al., 2004).

Klassische Virulenzfaktoren wie Toxine wurden für EcN bisher nicht beschrieben. Allerdings exprimiert EcN die Peptid-Polyketid-Hybridkomponente Colibactin (pks), die *in vitro* Doppelstrangbrüche in der DNA von intestinalen Epithelzellen erzeugt. Die Folge davon ist eine Unterbrechung des Zellzyklus mit eventuell nachfolgendem

Zelltod der Epithelzellen. Die Komponente pks ist innerhalb der phylogenetischen *E. coli*-Gruppe B2 weit verbreitet. Diese Gruppe umfasst sowohl ExPEC als auch kommensale *E. coli* wie EcN. Die Bedeutung von pks für die verschiedenen *E. coli* ist unklar. Einerseits kann die Blockierung der Zellzyklen zur langsameren Erneuerung der Epithelzellen führen, was die Kolonisierungsfähigkeit der pks-exprimierenden *E. coli* verbessern kann. Andererseits kann eine große Menge an pks im Darm ein prädisponierender Faktor für die Entwicklung eines Kolonkarzinoms sein (Nougayrede et al., 2006; Nowrouzian et al., 2005).

Neben der Modulation der intestinalen Mikroflora ist EcN in der Lage, die intestinale Barrierefunktion durch Regulation der Gen- und Proteinexpression der Epithelzellen zu verbessern (Tabelle 1. 3). So induziert die Proteinuntereinheit Flagellin des Flagellenfadens von EcN als löslicher Faktor in den intestinalen Epithelzellen die Produktion des humanen β -Defensins hBD-2, das einen antimikrobiellen Effekt auf die Mikroorganismen des Darms hat (Schlee et al., 2007). Zusätzlich werden die proinflammatorischen Zytokine MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), MIP-2 α (macrophage inflammatory protein-2 α) und MIP-2 β (macrophage inflammatory protein-2 β) exprimiert, die eine entzündliche Immunantwort bewirken (Ukena et al., 2005). Die in der Gegenwart von EcN verstärkt exprimierten Tight-junction-Proteine ZO-1 und ZO-2 und das regulatorische Enzym PKC ξ stabilisieren die Verbindungen der Epithelzellen und vermindern dadurch die Permeabilität für luminale Substanzen (Ukena et al., 2007; Zyrek et al., 2007).

EcN ist in der Lage, das Immunsystem seines Wirts zu modulieren, was durch Veränderung der Signaltransduktion auf verschiedenen Wegen erreicht wird. So ist bekannt, dass EcN die T-Zellfunktion durch Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen mit verminderter TNF α - und vermehrter IL-6-Sekretion und nachfolgender Induktion der Apoptose beeinflusst (Guzy et al., 2008). Außerdem wird die TNF α -induzierte Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-8 in intestinalen Epithelzellen unterdrückt (Kamada et al., 2008). Die Wirkung von EcN auf die Epithel- und Immunzellen auf molekularer Ebene ist zum Teil auf die Interaktion von Zellkomponenten und Strukturen von EcN mit den Toll-like-Rezeptoren TLR-2, TLR-4 und TLR-5 der Wirtszellen zurückzuführen, wodurch unterschiedliche Signalkaskaden induziert werden (Sturm et al., 2005; Grabig et al., 2006; Schlee et al., 2007; Wehkamp

et al., 2004). Diese aktivieren wiederum Transkriptionsfaktoren im Zellkern der Wirtszellen und nachfolgend die Expression bestimmter Gene als spezifische Antwort auf die Mustererkennung der Rezeptoren.

Die Interaktion von EcN mit seinem Wirtsorganismus führt also zu verschiedenen pro- und antiinflammatorischen Immunantworten. Diese dienen zusammen mit der intestinalen Mikroflora der Abwehr von Pathogenen und anderen entzündungsfördernden Einflüssen.

1.8 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Escherichia coli Nissle 1917 gehört zu den am besten untersuchten Probiotika, die zurzeit als Therapeutika oder Lebensmittelzusätze verwendet werden. Es sind inzwischen viele funktionelle Charakteristika bekannt, die vorteilhaft für die Kolonisierungsfähigkeit des Stamms sind und Hinweise auf den probiotischen Effekt liefern können. Allerdings gibt es noch keine schlüssigen Konzepte über das Zusammenspiel von Genen, Genprodukten und molekularen Mechanismen, die den probiotischen Charakter von EcN erklären. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Kenntnisse über die molekularen Mechanismen des probiotischen Stamms EcN zu erweitern. Die vollständige Annotation der Genomsequenz mit den beiden kryptischen Plasmiden pMUT1 und pMUT2 ist dabei die Grundlage für molekulare Analysen. Der Vergleich mit 13 bislang vollständig sequenzierten und annotierten *E. coli*-Genomen trägt zur Untersuchung der Genomstruktur und zur Identifizierung stammspezifischer Gene bei. Ein Schwerpunkt des Vergleichs liegt dabei auf dem uropathogenen Stamm *E. coli* CFT073, der große Ähnlichkeit zu EcN aufweist. Mit Hilfe von Deletionsmutanten sollen stammspezifische Gene identifiziert werden, die für den probiotischen Charakter von EcN wichtig sind. Intestinal *in vivo* regulierte Gene spielen dabei eine wichtige Rolle. Für die Identifizierung dieser im Intestinum regulierten Gene wird eine Promotor-Reporter-Fusionsbibliothek im Mausmodell eingesetzt.

Mit diesen molekularen Analysen sollen neue Grundlagen geschaffen werden, um die Möglichkeiten zur Untersuchung der probiotischen Charakteristika sowohl in EcN als auch in anderen probiotischen Mikroorganismen zu verbessern.

2 Material

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Chemikalien analytischen Reinheitsgrades sowie Nährmedien, Enzyme, Kits, Marker und Verbrauchsmaterialien werden von folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt), Applied Biosystems (Düsseldorf), Becton Dickinson (Heidelberg), Biozym (Hessisch Oldendorf), Eppendorf (Hamburg), Eurogentec (Köln), Finnzymes (Espoo, Finnland), Fluka (Seelze), GE Healthcare (München), Gibco/Invitrogen (Karlsruhe), Greiner (Frickenhäusen), J.T.Baker (Griesheim), MBI Fermentas (St Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach), NEB New England Biolabs (Frankfurt a.M.), Nunc (Wiesbaden), OLS (Hamburg), Oxoid (Wesel), Peqlab (Erlangen), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Ratiopharm (Ulm), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Göttingen), Schleicher und Schuell (Dassel), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München).

2.2 Puffer und Stammlösungen

Puffer und Stammlösungen werden mit deionisiertem Wasser (aqua dest.) und Chemikalien analytischen Reinheitsgrades nach Herstellerangaben angesetzt.

Tabelle 2. 1 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Stammlösungen

Name	Zusammensetzung
6 x DNA Ladepuffer	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 40% Sucrose
10 x PBS	1,5 M NaCl, 116 mM Na ₂ HPO ₄ , 18 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,0
20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat, pH 7,4, ad 1l aqua dest.
10 x TBE	890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA (pH 8,0)
TE	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0
Maleinsäurepuffer	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5
Detektionspuffer	0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, pH 9,5
Waschpuffer	Maleinsäurepuffer, 0,3% Tween-20

2.3 Nährmedien und Lösungen für Bakterienkulturen

Alle aufgeführten Nährmedien und Lösungen wurden, sofern sie nicht fertig bezogen wurden, mit deionisiertem Wasser (aqua dest.) angesetzt und, wenn nicht anders angegeben, durch Autoklavieren bei 121°C und 1,5 bar für 20 min sterilisiert.

Tabelle 2. 2 Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien für Bakterienkulturen

Nährmedium	Zusammensetzung
Einfriermedium	LB-Medium mit 40% Glycerin
LB-Agar	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Agar-Agar, ad 1 l aqua dest.
LB-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l aqua dest.; Modifikation: pH 2,5 bzw. pH 5,5 mit HCl einstellen
Müller-Hinton-Agar	2 g Fleischinfus, 17,5 g Caseinhydrolysat, 1,5 g Stärke, 13 g Agar-Agar, ad 1 l aqua dest.
MacConkey-Agar	17 g Pepton aus Casein, 3 g Pepton aus Fleisch, 5 g NaCl, 10 g Lactose, 1,5 g Gallensalzmischung, 0,3 g Neutralrot, 0,001 g Kristallviolett, 13,5 g Agar-Agar, ad 1 l aqua dest.
Micronutrient Stocklösung	0,054 g $(\text{NH}_4)_5\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,372 g H_3BO_3 , 0,108 g CoCl_2 , 0,036 g CuSO_4 , 0,24 g MnCl_2 , 0,042 g ZnSO_4 , ad 300 ml aqua dest.
10x MOPS Stocklösung	1.) 83,72 g MOPS, 7,17 g Tricin, 300 ml aqua dest., pH 7,4 mit KOH einstellen; ad 440 ml aqua dest. 2.) 0,028 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in 10 ml aqua dest. 3.) 50 ml 1,9 M NH_4Cl , 10 ml 0,276 M K_2SO_4 , 0,25 ml 0,02 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,1 ml 2,5 M MgCl_2 , 100 ml 5 M NaCl, 0,2 ml Miconutrient Stocklösung, 387 ml aqua dest.
MOPS-Minimalmedium	100 ml 10x MOPS Stocklösung, 10 ml 0,132 M K_2HPO_4 , 880 ml aqua dest., pH 7,2 mit NaOH, 10 ml 20% Glucoselösung
NZY+-Bouillon	10 g NZ-Amin (Caseinhydrolysat), 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, pH 7,5, ad 1 l aqua dest.; nach dem Autoklavieren: 12,5 ml 1 M MgSO_4 , 12,5 ml MgCl_2 , 20 ml 20% Glucoselösung
SOB-Medium	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,584 g NaCl, 0,186 g KCl, pH 7,5, ad 1 l aqua dest.
SOC-Medium	SOB-Medium mit 10 mM MgSO_4 , 10 mM MgCl_2 , 0,4% Glucose
Sucrose-Agar	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Agar-Agar, ad 750 ml aqua dest. Nach dem Autoklavieren: 250 ml 40% Sucroselösung

2.4 Antibiotika

Die Zugabe eines Antibiotikums zum Nährmedium dient der Erzeugung eines Selektionsdrucks zur selektiven Anzucht von Bakterien, die genomisch integrierte oder plasmidkodierte Antibiotikaresistenzgene als Selektionsmarker tragen. Die verwendeten Antibiotika sind in Tabelle 2. 3 aufgeführt. Stocklösungen werden durch Zugabe von aqua dest. bzw. bei Chloramphenicol durch Zugabe von reinem Ethanol hergestellt. Alle Antibiotika werden den Nährmedien nach dem Abkühlen auf unter 50°C in einer 1:1000-Verdünnung aus der Stocklösung zugesetzt.

Tabelle 2. 3 Verwendete Antibiotika und deren Endkonzentrationen im Medium

Antibiotikum	Stoffklasse	Wirkung	Konzentration [µg/ml]
Ampicillin (Amp)	β-Lactame	Hemmung der Zellwandsynthese	100 bzw. 200
Chloramphenicol (Cm)	Benzolderivat	Hemmung der Proteinbiosynthese am Ribosom	25
Gentamicin (Gm)	Aminoglycosid	Hemmung der Proteinbiosynthese am Ribosom	50
Kanamycin (Km)	Aminoglycosid	Hemmung der Proteinbiosynthese am Ribosom	50

2.5 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und deren Genotypen sind in Tabelle 2. 4 aufgelistet.

Tabelle 2. 4 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> Nissle 1917 (EcN)	Wildtyp O6:K5:H1	(Nissle, 1918)
EcNΔpMUT1	pMUT1-Deletionsmutante von EcN	diese Arbeit
EcNΔpMUT2	pMUT2-Deletionsmutante von EcN	diese Arbeit
EcNΔpMUT1+2	Plasmidfreie Deletionsmutante von EcN	diese Arbeit
EcN-rpoS ^{CFT}	<i>rpoS</i> aus <i>E. coli</i> CFT073	diese Arbeit
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> Φ80dlacZΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ-	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> MDS42	Genomreduzierter <i>E. coli</i> MG1655 mit 3730 Genen	Scarab Genomics LLC, Madison, WI
<i>E. coli</i> sm10λpir	<i>thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu pir</i> R6K Km	(Simon et al., 1983)
<i>E. coli</i> MG1655	K-12 Isolat	(Blattner et al., 1997)
<i>E. coli</i> CFT073	Wildtyp O6:K2:H1 <i>hlyA papG</i>	(Mobley et al., 1990)
<i>E. coli</i> MHH073-3	<i>E. coli</i> CFT Δ <i>hlyA</i>	M. Hartmann, Hannover
<i>E. coli</i> CFT-rpoS ^{EcN}	<i>rpoS</i> aus <i>E. coli</i> Nissle 1917	diese Arbeit
<i>E. coli</i> 126 814 (EHEC)	Wildtyp O26:H11 <i>stx2 eaeA hlyA</i>	Patientenisolat MHH
<i>E. coli</i> MHH 126-5	<i>E. coli</i> 126 814 Δ <i>rpoS</i>	(Coldewey et al., 2007)
EcNDS1	ΔGEI I	diese Arbeit
EcNDS2	ΔGEI II	diese Arbeit
EcNDS3	Δpks	diese Arbeit
EcNDS4	ΔGEI I ΔGEI II	A. Zschüttig, Dresden
EcNDS5	ΔGEI I Δpks	A. Zschüttig, Dresden
EcNDS6	ΔGEI II Δpks	A. Zschüttig, Dresden
EcNDS7	Δpks Δybt	A. Zschüttig, Dresden
EcNDS8	ΔGEI I ΔGEI II Δpks	A. Zschüttig, Dresden
EcNDS9	Δpkr	A. Zschüttig, Dresden
EcNDS10	Δybt	A. Zschüttig, Dresden
EcNDS11	Δtrd1	A. Zschüttig, Dresden
<i>S. typhimurium</i>	Wildtyp	Patientenisolat TUD
<i>E. coli</i> E2348/69 (EPEC)	Wildtyp	(Donnenberg und Kaper, 1992)

2.6 Plasmide

Die verwendeten Vektoren und Plasmidkonstrukte sind in Tabelle 2. 5 unter Angabe der Referenzen und Eigenschaften aufgelistet.

Tabelle 2. 5 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pUC19	<i>bla lacZ</i>	Klonierung	(Yanisch-Perron et al., 1985)
pBR322	<i>bla tet</i>	Klonierung	(Bolivar et al., 1977)
pMHH1	<i>bla sacB</i> oriR6K	Suizidvektor	M. Hartmann, Hannover
pMW82	<i>bla gfp-ova</i>	Klonierung	(Bumann, 2002)
pST76-A	<i>bla ori(ts)</i> ; <i>IsceI</i> -Schnittstelle	Suizidvektor	(Posfai et al., 1997)
pBCIsce	<i>isceI, cm</i>	Helferplasmid	(Feher et al., 2008)
pSB417	<i>luxCDABE, bla</i>	Luciferin-Luciferase-Expression	(Winson et al., 1998)
pGFP	<i>gfp, km</i>	GFP-Expression	(Mampel et al., 2006)
pMW211	<i>dsred, bla</i>	DsRed-Expression	(Sorensen et al., 2003)
pDS3	<i>E. coli</i> CFT073 <i>rpoS</i> in pBR322	Komplementation	diese Arbeit
pDS4	<i>E. coli</i> Nissle1917 <i>rpoS</i> in pBR322	Komplementation	diese Arbeit
pDS5	pMUT1-Fragment in pMHH1	Suizidvektor pMUT1-Deletion	diese Arbeit
pDS6	pMUT2-Fragment in pMHH1	Suizidvektor pMUT2-Deletion	diese Arbeit
pDS7	<i>E. coli</i> Nissle1917 <i>rpoS</i> in pUC19	Komplementation	diese Arbeit
pDS10	<i>E. coli</i> Nissle1917 <i>rpoS</i> in pMHH1	Suizidvektor <i>rpoS</i> -Austausch	diese Arbeit
pDS11	<i>E. coli</i> CFT073 <i>rpoS</i> in pMHH1	Suizidvektor <i>rpoS</i> -Austausch	diese Arbeit
pDS15	<i>luxCDABE</i> in pUC19	Luciferin-Luciferase-Expression	diese Arbeit
pDS17	<i>luxCDABE</i> in pMW82Δ <i>gfp-ova</i>	<i>luxCDABE</i> -Negativkontrolle	diese Arbeit
pDS18	<i>lux'DABE</i> in pMW82Δ <i>gfp-ova</i>	Promotor- <i>lux</i> -Klonierungsvektor	diese Arbeit
pDS19	P2- <i>luxCD'</i> in pDS18	Promotor- <i>lux</i> -Konstrukt	diese Arbeit
pDS20	P3- <i>luxCD'</i> in pDS18	Promotor- <i>lux</i> -Konstrukt	diese Arbeit
pDS21	P1- <i>luxCD'</i> in pDS18	Promotor- <i>lux</i> -Konstrukt	diese Arbeit
pDS22	P4- <i>luxCD'</i> in pDS18	Promotor- <i>lux</i> -Konstrukt	diese Arbeit
pDS23	P4a- <i>luxCD'</i> in pDS18	Promotor- <i>lux</i> -Konstrukt	diese Arbeit
pDS24	P4b- <i>luxCD'</i> in pDS18	Promotor- <i>lux</i> -Konstrukt	diese Arbeit
pDS25	P5- <i>luxCD'</i> in pDS18	Promotor- <i>lux</i> -Konstrukt	diese Arbeit
pDS26	P5- <i>luxCD'</i> in pDS18	Promotor- <i>lux</i> -Konstrukt	diese Arbeit
pST76-A-G1	Fusionsprodukt AB (GEI I) in pST76-A	Suizidvektor GEI-Deletion	diese Arbeit
pST76-A-G2	Fusionsprodukt AB (GEI II) in pST76-A	Suizidvektor GEII-Deletion	diese Arbeit
pST76-A-pks	Fusionsprodukt AB (pks) in pST76-A	Suizidvektor pks-Deletion	diese Arbeit

2.7 Zellkulturmedien und Reagenzien

Für die Zellkultur werden die in Tabelle 2. 6 aufgeführten Medien und Reagenzien verwendet.

Tabelle 2. 6 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Medien und Reagenzien	Hersteller
DAPI	Invitrogen (Karlsruhe)
ISCOVE's Kompletmedium	Biochrom KG (Berlin)
FCS	Biochrom KG (Berlin)
DMSO	AppliChem (Darmstadt)
Slow Fade Gold Eindeckmedium	Molecular Probes/ Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin-EDTA (0,05%/ 0,02%)	Gibco/ Invitrogen (Karlsruhe)
Triton X-100	Sigma (München)
Trypanblau	Gibco/ Invitrogen, (Karlsruhe)
Vybrant DiO Cell-Labeling Solution	Gibco/ Invitrogen, (Karlsruhe)

Die Kultivierung der eukaryotischen Zelllinien wird in ISCOVE's Kompletmedium mit 10% FCS durchgeführt, das nachfolgend als Zellkulturmedium bezeichnet wird. Als Einfriermedium für die Zellkultur dient ISCOVE's Kompletmedium mit 20% FCS und 10% DMSO.

2.8 Zelllinien

Es werden zwei verschiedene humane intestinale Epithelzelllinien verwendet, die nachfolgend beschrieben sind.

Lovo-Zellen:

Lovo-Zellen sind humane Kolonadenokarzinom-Zellen, die adhärent und in konfluenten Monolayern wachsen. Sie wurden ursprünglich aus Lymphknotenmetastasen isoliert (Drewinko et al., 1976).

Caco-2

Caco-2-Zellen sind humane Kolonadenokarzinom-Zellen, die ursprünglich aus einem Primärtumor stammen. Sie wachsen adhärent und in Monolayern (Fogh et al., 1977).

2.9 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide werden von den Firmen MWG (Ebersberg) und Biomers (Ulm) bezogen. Eine Liste der Oligonukleotide ist im Anhang (8.2) zu finden.

2.10 Software

Die in dieser Arbeit angewendeten Computerprogramme sind in Tabelle 2. 7 aufgeführt.

Tabelle 2. 7 Übersicht über die verwendete Software

Name	Hersteller
Carl Zeiss AIM, LSM Image Browser	Carl Zeiss, Jena
Chromas Version 2.31	Technelysium Pty Ltd., Australien
Clone Manager Version 6.0	Sci Ed Central, Cary, USA
DNA Star 6	DNA Star, Madison, USA
GenDB 2.4	Bioinformatics Resource Facility, Bielefeld
Lasergene 7	DNA Star, Madison, USA
Mauve 2.2.0	Genome Evolution Laboratory, Madison, USA
Office XP	Microsoft, Redmont, USA
Reference Manager Version 11	Thomson Research Soft., San Francisco, USA

3 Methoden

3.1 Kultivierung von prokaryotischen Zellen

3.1.1 Anzucht, Wachstumsbedingungen und Stammhaltung von Bakterien

Die Bakterienstämme werden, sofern es nicht anders angegeben ist, in LB-Medium oder auf LB-Agar angezogen, die gegebenenfalls mit Antibiotika supplementiert sind (siehe 2.4). Beimpfte Agarplatten werden in der Regel über Nacht bei 37°C inkubiert, während temperaturempfindliche Stämme bei maximal 30°C bebrütet werden. Die Stämme werden für kurze Zeiträume bei 4°C auf Festmedium gelagert. Für die Anzucht in Flüssigkulturen werden Einzelkolonien von Agarplatten in LB-Medium suspendiert und über Nacht mit 150-200 rpm im Schüttler (Kompaktschüttler, Edmund Bühler GmbH, Hechingen) inkubiert. Die Inkubation erfolgt je nach Anwendung bei Raumtemperatur (RT), 30, 37 oder 42°C. Das Kulturvolumen beträgt in der Regel 1/5 des Schüttelkolbenvolumens.

Die Übernachtskulturen (ÜN-Kulturen) können z.B. direkt für DNA-Präparation eingesetzt werden (3.3.4) oder zum Animpfen von Hauptkulturen genutzt werden.

Für die langfristige Lagerung von Bakterienstämmen werden frische Kolonien von Agarplatten in Einfriermedium (2.3) resuspendiert und bei -80°C eingefroren.

3.1.2 Bakterienwachstum in Flüssigkulturen

Das Wachstum der Bakterien in einer Flüssigkultur wird durch photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) bestimmt. Die Messung findet nach entsprechender Verdünnung der Kultur statt. Für die Umrechnung der optischen Dichte in KbE/ml gilt als Richtwert für *E. coli*: $OD_{600}=1$ entspricht $1 \cdot 10^9$ KbE/ml.

Die genauere Bestimmung der Lebendkeimzahl für einen bestimmten Stamm im Verlauf der Kultivierung ist im Abschnitt 3.1.3 beschrieben.

3.1.3 Wachstumskurven

Die Kontrolle des Bakterienwachstums und die gleichzeitige Bestimmung der Lebendkeimzahl in KbE/ml Bakteriensuspension geschehen mit Hilfe von Wachstumskurven. Eine Schüttelkolbenkultur mit LB-Medium, MOPS-Minimalmedium oder Zellkulturmedium wird aus einer ÜN-Kultur (3.1.1) angeimpft. In definierten Zeitabständen wird die OD₆₀₀ photometrisch bestimmt (3.1.2) und gleichzeitig eine Verdünnungsreihe auf LB-Agar oder Müller-Hinton-Agar ausplattiert. Die Korrelation von OD₆₀₀ und KbE/ml wird graphisch dargestellt. Aus dem Diagramm lassen sich die Lebendzellzahlen für weitere Kulturen desselben Stamms unter gleichen Bedingungen abschätzen.

3.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die humanen Epithelzelllinien Lovo und Caco-2 (2.8) verwendet werden in Kryoröhrchen mit $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Einfriermedium (2.7) in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Anzucht der Zellen wird ein Kryoröhrchen zügig aufgetaut und mit dem 20-fachen Volumen Zellkulturmedium versetzt. Dieser Schritt dient der Verdünnung des DMSO-haltigen Einfriermediums, das auf wachsende Zellen zytotoxisch wirkt. Die Zellen werden pelletiert (10 min 800 rpm bei RT; Varifuge 3.0R, Heraeus Instruments, Hanau), in 5 ml frischem Zellkulturmedium aufgenommen und in eine kleine Zellkulturflasche (25 cm²) überführt. Die Inkubation erfolgt im Zellkulturbrutschrank (Heraeus CO₂ Incubator BBD 6220; Heraeus Instruments, Hanau) bei 37°C und 5% CO₂. Beide Zelllinien werden zweimal pro Woche im Verhältnis 1:5 bis 1:10 gesplittet. Dazu werden die adhärenenten Zellen mit PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin-EDTA nach einer Inkubation von ca. 5 min bei 37°C von der Gefäßwand gelöst. Die Reaktion des Trypsins wird durch Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt. Die Zellen werden mit Hilfe einer Pipette resuspendiert, gezählt und in neue Zellkulturflaschen umgesetzt oder in Zellkulturplatten ausgesät. Die Bestimmung der Zellzahl lebender Zellen erfolgt mikroskopisch aus einer Zellsuspension mit einer Neubauer-Zählkammer in einer 1:2-Verdünnung mit Trypanblau. Der Farbstoff durchdringt die Zellmembran abgestorbener Zellen und färbt diese blau an. Lebende Zellen nehmen dagegen keinen Farbstoff auf.

Für Zellkulturversuche werden Caco-2-Zellen zwischen der 2. und der 19. Passage und Lovo-Zellen der Passagen 2 bis 15 benutzt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente aus kleinsten Mengen einer DNA-Matrize können durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfacht werden. Diese enzymatische *in vitro* Replikation führt zu einer nahezu exponentiellen Amplifikation der DNA-Zielsequenz, die durch spezifische Oligonukleotide (Primer) definiert wird (Saiki et al., 1985). Als Enzyme werden DNA-Polymerasen wie Taq-Polymerase (z.B. GoTaq, Promega; Omni-Taq, OLS) oder Polymerasen mit zusätzlicher 3'-5'-Exonuklease-Funktion (Phusion High Fidelity Polymerase, Finnzymes) eingesetzt, die durch die Korrektur falsch eingebauter Nukleotide eine sehr niedrige Fehlerrate aufweisen. Die von den Herstellern angegebene Fehlerrate liegt hier bei $4,4 \cdot 10^{-7}$ im Vergleich zu $1 \cdot 10^{-4}$ bis $2 \cdot 10^{-5}$ der Taq-Polymerase und bezieht sich auf die errechnete Wahrscheinlichkeit für einen Fehler bei einer Fragmentlänge von 1 kb und 30 PCR-Zyklen (Frey und Suppmann, 1995).

Die PCR-Reaktion sollte unter optimalen Bedingungen ablaufen, dazu werden auf die Enzyme abgestimmte Puffer, Konzentrationen der Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs) und Primer sowie die Temperaturbedingungen nach Herstellerangaben verwendet.

Die Amplifikation von DNA mittels PCR beginnt mit der initialen Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Matrize. Bei Temperaturen über 94°C werden die beiden DNA-Stränge separiert. Es folgen etwa 35 Zyklen mit Denaturierung, Anlagerung der Primer (Annealing) und Elongation zur Synthese des komplementären DNA-Strangs. Nach einer finalen Elongationszeit von 5-7 min wird der Ansatz auf 4°C heruntergekühlt und die Reaktion damit unterbunden.

Die Annealingtemperatur (T_a) der Primer kann anhand der Anzahl der Nucleotide berechnet werden:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = (A+T) \times 2 + (C+G) \times 4$$

$$T_a [^{\circ}\text{C}] = T_m - 2$$

T_a sollte zwischen 50 und 60°C liegen, während das Temperaturoptimum für die Taq-Polymerase bei 72°C liegt. Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des

Amplifikats und der Leistung des eingesetzten Enzyms, die vom Hersteller angegeben ist. Die Taq-Polymerase synthetisiert etwa 1 kb/min.

PCR-Reaktionen werden in Thermocyclern der Firmen Landgraf (Langenhagen), Biometra (Göttingen) und Eppendorf (Hamburg) durchgeführt.

3.3.2 Fusions-PCR

Mit der Fusions-PCR kann aus zwei PCR-Produkten ein Fusionsprodukt generiert werden, wie es in Abbildung 3. 1 schematisch dargestellt ist.

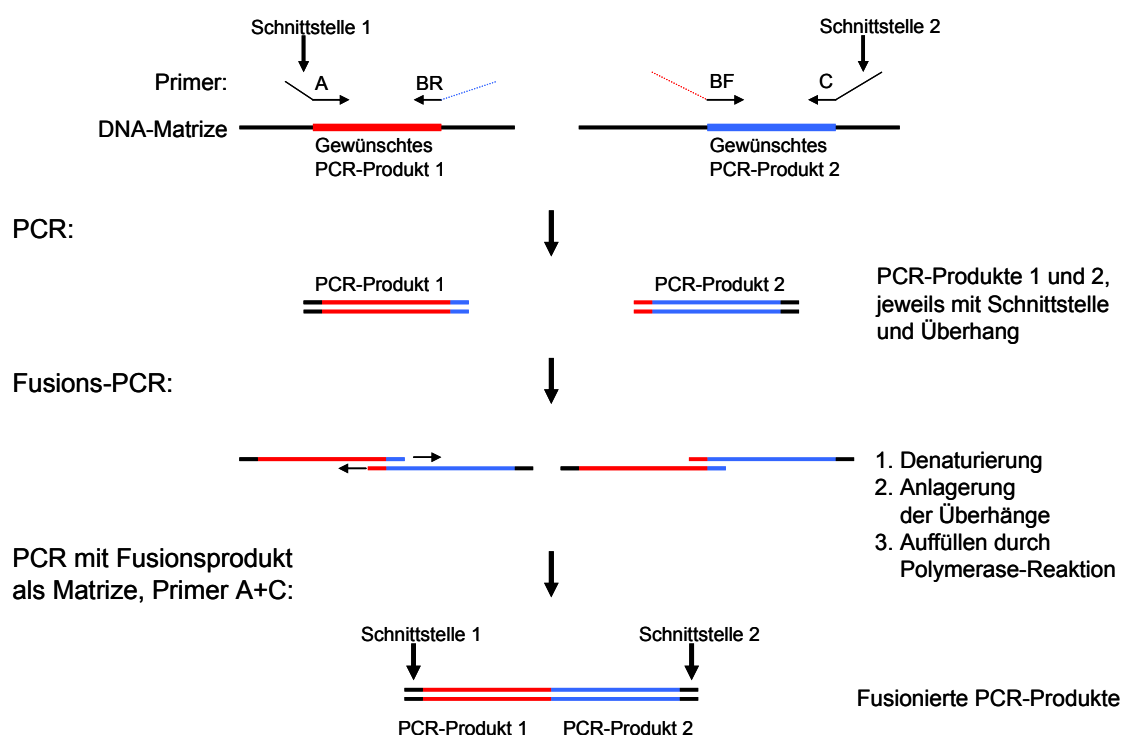


Abbildung 3. 1 Generierung eines Fusionsproduktes aus zwei PCR-Produkten

Zwei PCR-Produkte (PCR-Produkt 1 bzw. 2) werden mit den Primern A und BR bzw. BF und C von den Matrizen (Sequenz 1 und Sequenz 2) amplifiziert. Die Primer A und C enthalten jeweils eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym, die Primer BF und BR enthalten einen Überhang, der jeweils komplementär zur anderen Sequenz ist. Diese Überhänge lagern sich in der anschließenden Fusions-PCR aneinander. Die dabei neu entstehenden Überhänge werden durch die DNA-Polymerase aufgefüllt, und es entsteht das Fusionsprodukt. In einer weiteren PCR wird dieses mit den äußeren Primern A und C amplifiziert.

Mittels PCR (3.3.1) werden zwei PCR-Produkte mit Überhang hergestellt. Die dazu verwendeten Primerpaare bestehen jeweils aus einem Primer mit einer Restriktions-schnittstelle (Primer A bzw. C) und einem Primer mit Überhang (Primer BF bzw. BR).

Der Überhang besteht aus 10-25 Nukleotiden und ist so gewählt, dass er komplementär zu dem zu fusionierenden PCR-Produkt ist. In einem Reaktionsansatz werden gereinigte PCR-Produkte (3.3.9), DNA-Polymerase und dNTPs mit Reaktionspuffer gemischt. In 20 PCR-Zyklen werden die PCR-Produkte fusioniert, indem nach der Denaturierung der Stränge die komplementären Überhänge hybridisieren und die neu entstehenden Überhänge durch die Polymerase aufgefüllt werden. Etwa 1/10 dieses Reaktionsansatzes wird anschließend direkt als Matrize für die Amplifikation des Fusionsproduktes in einer Standard-PCR (3.3.1) mit den beiden äußeren Primern (Primer A und C) eingesetzt.

Für die Fusions-PCR wird die DNA-Polymerase Phusion High Fidelity Polymerase (Finnzymes) eingesetzt, um die Fehlerrate während der Amplifikation gering zu halten und die Erzeugung von Punktmutationen in der Genomsequenz zu vermeiden.

3.3.3 Sequenzierung kurzer DNA-Fragmente

Die Sequenzierung erfolgt nach der Kettenabbruch-Reaktion nach Sanger (Sanger et al., 1977) und dem BigDye Terminator-Kit (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers. Dieses enthält neben einer DNA-Polymerase eine Mischung aus dNTPs und fluoreszenzmarkierten und farbkodierten ddNTPs (Didesoxynucleosidtriphosphat). In einer Sequenzierreaktion wird ausgehend von einem Primer der komplementäre Strang der Matrize, die aus Plasmid-DNA oder gereinigtem PCR-Produkt besteht, durch eine DNA-Polymerase verlängert. Dabei werden nach dem Zufallsprinzip neben dNTPs auch ddNTPs eingebaut, die durch die fehlende zweite OH-Gruppe die weitere Verknüpfung von dNTPs verhindert. Die dabei entstehende Mischung aus unterschiedlich langen Fragmenten wird anschließend über eine Sepharosegelsäule gereinigt (3.3.9). Die Auftrennung der Fragmente mittels Kapillarelektrophorese sowie die Detektion der durch Laserstrahlen angeregten verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe erfolgt mit dem Sequenzierer ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Medizinischen Hochschule Hannover und mit dem Sequenzierer ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) am Institut für

Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Technischen Universität Dresden. Die Chromatogramme werden mit entsprechender Software (2.10) bearbeitet.

3.3.4 Isolierung von DNA und RNA

3.3.4.1 Präparation von genomischer DNA

Die genomische DNA von Bakterien wird aus einer 5 ml ÜN-Kultur mit Hilfe der genomic tip100-Säulen (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Dabei werden die bakteriellen Zellwände unter alkalischen Bedingungen und Zusatz von Detergenzien lysiert. RNase degradiert die RNA, und EDTA hemmt Nuklease-Aktivität. Der Abbau von Proteinen erfolgt durch Lysozym und Proteinase K. Die DNA wird an die Anionen-Austauschersäule gebunden. RNA, niedermolekulare Substanzen und Proteine durch Waschen entfernt. Die genomische DNA wird mit einem Hochsalzpuffer eluiert. Durch Präzipitation mit Isopropanol kann die DNA anschließend entsalzt und ankonzentriert werden.

3.3.4.2 Präparation von Plasmid-DNA

Für Präparationen von Plasmid-DNA in kleinem, mittlerem oder großem Maßstab werden verschiedene Kits eingesetzt (QIAprep Spin Miniprep, Midiprep und Maxiprep Kit, Qiagen, Gene Elute Miniprep Kit, Sigma). Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgt dabei nach dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterien in Gegenwart von NaOH, SDS und RNase A. Dabei wird Plasmid-DNA freigesetzt, die chromosomale DNA wird weitestgehend zusammen mit Proteinen und Zelldetritus pelletiert. In Lösung befindliche Plasmid-DNA wird unter Niedrigsalzbedingungen an eine Anionen-Austauschersäule gebunden, RNA und Proteine werden durch Waschen entfernt. Die DNA wird anschließend mit Hochsalzpuffer eluiert. Die Volumina der Bakterienkulturen sowie die Säulengrößen werden in Abhängigkeit von der Plasmidgröße, Kopienzahl pro Zelle und erwartetem Ertrag nach Herstellerangaben gewählt.

3.3.4.3 Isolierung von RNA

Die Genexpression und -regulation in humanen Kolonepithelzellen unter dem Einfluss von *E. coli*-Wildtypstämmen und Mutanten (Co-Kulturassay) kann mit quantitativer

Realtime-PCR (qRT-PCR) auf cDNA-Basis, die aus RNA gewonnen wird, nachgewiesen werden. Zur Isolierung der Gesamt-RNA der Epithelzellen wird das gebrauchsfertige peqGold TriFast-Reagenz (Peqlab) verwendet. TriFast besteht aus einer monophasigen Phenol- und Guanidinisothiocyanatlösung. Alle Arbeitsschritte werden unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt.

Die adhärennten Zellen werden in TriFast homogenisiert und die RNA nach Herstellerangaben isoliert. Um sehr saubere RNA zu erhalten wird ein zusätzlicher Reinigungsschritt mit BCP (1-Brom-3-Chlorphenol) als Chloroform-Ersatz durchgeführt. Die Phasentrennung wird durch Zentrifugation (13000 rpm, 10 min, RT, Heraeus Biofuge pico, Heraeus Instruments, Hanau) erreicht. Ein DNase-Verdau (DNA-free[®]-Kit, Applied Biosystems/Ambion) degradiert DNA in dem Ansatz. Die RNA wird mit einer Ethanol-fällung (3.3.9.4) präzipitiert und gewaschen. Nach dem Trocknen wird das RNA-Pellet in TE-Puffer aufgenommen und die RNA- Konzentration der Proben photometrisch bestimmt (3.3.8) Die RNA-Proben werden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3.5 cDNA-Synthese

Für Analysen der Genexpression wird RNA revers komplementär in cDNA transkribiert. Dies geschieht durch das Enzym Reverse Transkriptase MMLV-RT (Invitrogen) nach Herstellerprotokoll. Dabei werden 2,5 µg RNA mit dNTPs, Oligo-dT-Primern und RNase-freiem H₂O (Invitrogen) gemischt, zum Denaturieren für 5 min auf 65°C erhitzt und sofort danach auf Eis gekühlt. Dann wird der Mastermix aus Puffer, DTT, dem RNase-Inhibitor RNasin (Promega) und dem Enzym MMLV-RT zugegeben, gemischt und die enzymatische Reaktion für 50 min bei 37°C im Thermocycler (Biometra, Göttingen) zugelassen. Das anschließende Erhitzen auf 70°C für 15 min inaktiviert die Enzyme. Die cDNA wird bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.6 Quantitative Realtime-PCR

Die quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR) wird wie bei Ukena *et al.* 2005 (Ukena *et al.*, 2005) beschrieben im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, durchgeführt. Die Analyse wird im ABI Prism Cyclet (Applied Biosystems, Foster City,

CA, USA) mit dem SYBR Green PCR Kit (Stratagene) und optimierten Primern durchgeführt. Die Normalisierung der mRNA-Mengen wird anhand von Standards und mit dem Haushaltsgen RPS9 durchgeführt.

3.3.7 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente bis zu 20 kb können mittels Agarosegelelektrophorese im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Größe und der Ladung der Fragmente. Die Auftrennung erfolgt in 0,5-2% Agarosegelen in TBE-Puffer bei einer Spannung von 100-170V in Abhängigkeit des Elektrodenabstandes. Zum Aufladen der DNA wird diese mit 6x Ladepuffer versetzt, die die Dichte der Lösung erhöht. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen und der DNA-Konzentration wird ein Marker (Smart Ladder, Eurogentec) mitgeführt. Die Färbung der DNA erfolgt im separaten Ethidiumbromidbad. Durch die Interkalation des Ethidiumbromids in die Basen der DNA verändert sich das Absorptionsspektrum des Ethidiumbromids, wodurch die Fluoreszenz nach der Anregung mit UV-Licht stark erhöht wird. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur DNA-Konzentration (Waring, 1965). Die Dokumentation der Agarosegele erfolgt mit dem GelDoc System (Bio-Rad, München).

3.3.8 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

3.3.8.1 Bestimmung der DNA-Konzentration im Agarosegel

Im Agarosegel kann die DNA-Konzentration durch Vergleich mit der Intensität der Markerbanden bestimmt werden, die nach Herstellerangaben eine definierte DNA-Konzentration bei dem eingesetzten Markervolumen haben (3.3.7). Dazu werden die Bandenstärken von 1-2 μ l DNA nach Auftrennung und Färbung mit EtBr mit den Markerbanden verglichen und die DNA-Konzentration abgeschätzt.

3.3.8.2 Photometrische Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration

Bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA wird aus der Extinktion bei der Wellenlänge von 260 nm (A_{260}) und dem spezifischen molaren Extinktionskoeffizienten ϵ für DNA bzw. RNA der Nukleinsäuregehalt einer Lösung

berechnet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt am Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech, GE Healthcare, München) gegen TE-Puffer. Die Konzentration der Proben wird dabei mit folgender Formel bestimmt:

$$c = A_{260} \cdot \epsilon \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

c	Konzentration	
A_{260}	Extinktion bei 260 nm	
ϵ_{DNA}	= 50	spezifischer molarer Extinktionskoeffizient
ϵ_{RNA}	= 40	

Die Reinheit der Proben bzw. die Verunreinigung durch Proteine wird aus dem Quotienten der Extinktionen bei 260 und 280 nm (A_{260}/A_{280}) ermittelt. Das Verhältnis soll zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.3.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

3.3.9.1 Isolierung und Ankonzentrierung von DNA über eine Säule

Die Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten über eine Glasfaser-Matrix wird mit dem illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) durchgeführt. Dabei wird DNA in Anwesenheit chaotroper Salze an die Matrix gebunden. Salze und andere Verunreinigungen werden mit einem ethanolhaltigen Puffer herausgewaschen. Nach dem Trocknen der Matrix wird die DNA mit aqua dest. eluiert.

3.3.9.2 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Die Isolierung und Aufreinigung verschieden großer DNA-Fragmente aus dem Agarosegel erfolgt mittels Gelextraktion. Nach der Agarosegelelektrophorese (3.3.7) werden die gesuchten DNA-Banden unter UV-Licht markiert und anschließend ausgeschnitten. Die DNA wird mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) aus dem Agarosegel extrahiert, indem das Gelstück in einem chaotropen Puffer bei 50°C gelöst und die DNA unter Hochsalzbedingungen an eine Silica-Membran gebunden wird. Verunreinigungen werden durch Waschen mit einem ethanolhaltigen Puffer entfernt. Die DNA wird mit Nidrigsalzpuffer oder aqua dest. eluiert.

3.3.9.3 Aufreinigung von Sequenzierprodukten

Für die Aufreinigung von Sequenzierprodukten werden einzelne Centri Sep-Säulen (Princeton Separations, Adelphia, USA) oder bis zu 96 Säulen aus hydratisierter Sepharose Sephadex G-50 (GE Healthcare) nach Herstellerprotokoll verwendet. Die Gelfiltration dient der schnellen und effizienten Abtrennung von Nukleotiden und Salzen, die sich in der Sequenzierung störend auswirken.

3.3.9.4 Ethanolfällung

Das Aufreinigen, Ankonzentrieren und Umpuffern von DNA und RNA aus wässriger Lösung wird durch die Ethanolfällung erreicht. Dazu wird die Nukleinsäurelösung mit 1 µl Glycogen (20 µg/µl, Roche) und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 gemischt und mit dem 2,5-fachen Volumen an eiskaltem absoluten Ethanol versetzt, gemischt und für etwa 1 h bei -80°C gefällt. In Anwesenheit der Salze und des Ethanols ist die Nukleinsäure schwerer löslich und fällt aus. Glycogen dient dabei als inerte Trägersubstanz, die bei hohem Salzgehalt mit der Nukleinsäure ein Präzipitat bildet. Durch Zentrifugation (45 min, 15000 rpm, 4°C, Biofuge primoR, Heraeus Instruments, Hanau) wird die DNA pelletiert und anschließend mit 1 ml 70% EtOH gewaschen (15 min, 15000 rpm, 4°C). Der Überstand wird dekantiert und das Pellet etwa 30 min bei 45°C in einer Vakuumzentrifuge (Eppendorf Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg) getrocknet. Die Nukleinsäure wird zur weiteren Verarbeitung in TE-Puffer oder aqua dest. aufgenommen.

3.3.10 Modifikation und Klonierung von DNA

3.3.10.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA spezifisch an einer häufig palindromischen Erkennungssequenz von 4-8 nt schneiden können. Mit Hilfe der Restriktionsenzyme können sowohl DNA-Sequenzen analysiert als auch DNA-Fragmente und Vektoren für Klonierungen vorbereitet werden. Dabei entstehen je nach Enzym und Schnittstelle glatte oder überhängende Enden, wobei diese entweder einen 3'- oder einen 5'-Überhang aufweisen. Es werden in der Regel 200-3000 ng DNA

eingesetzt, die mit 10 U Restriktionsenzym (NEB) pro 1 µg DNA etwa 1 h unter optimalen Reaktionsbedingungen bezüglich Pufferzusammensetzung und Inkubationstemperatur nach Herstellerangaben verdaut und anschließend durch Hitze inaktiviert werden.

3.3.10.2 T4-DNA-Polymerase

T4-DNA-Polymerase (NEB) katalysiert die Synthese von DNA in 5'-3'-Richtung in Gegenwart von Matrize und Primer und hat eine 3'-5'-Exonukleasefunktion. Das Enzym wird zur Modifikation der Enden von DNA-Fragmenten eingesetzt. Überhänge von PCR-Produkten oder DNA-Fragmenten, die nach einem Restriktionsverdau oder dem mechanischen Scheren von DNA entstehen, werden entweder unter Zugabe von dNTPs aufgefüllt oder durch Entfernen der überhängenden Nukleotide geglättet. Die T4-DNA-Polymerase wird nach Herstellerangaben verwendet.

3.3.10.3 Dephosphorylierung

Für effiziente Klonierungen ist es notwendig, die Religation der Vektorenden von bereits linearisierten Plasmiden mit kompatiblen überhängenden oder glatten Enden zu verhindern. Durch die Behandlung mit der Phosphatase SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, USB, Cleveland, Ohio, USA) werden die Enden durch Abspaltung der 5'-Phosphate dephosphoryliert. Dadurch können keine weiteren Nukleotide an diesem Ende angefügt werden. Erst die Verknüpfung mit phosphorylierten DNA-Fragmenten unter Ligase-Einwirkung (3.3.10.4) ermöglicht den Ringschluss der Plasmide.

3.3.10.4 Ligation

Das Enzym T4-DNA-Ligase (NEB) kann DNA-Fragmente durch Ausbildung von Phosphodiesterbindungen unter geeigneten Reaktionsbedingungen verknüpfen. Für eine effiziente Ligation sollten die zu verknüpfenden Enden kompatibel sein, d.h. es müssen Enden gleicher Orientierung (3'/3' oder 5'/5') und gleicher Überhangssequenz oder glatte Enden ohne Überhang sein. Zur Verhinderung der Religation des Vektors bei kompatiblen Vektorenden werden diese dephosphoryliert (3.3.10.3). Die einzusetzende Menge der Vektoren und der zu klonierenden Fragmente wird aus dem molaren

Verhältnis von Vektor zu klonierendem Fragment und der Art der zu verknüpfenden Enden berechnet:

$$\text{Fragment [ng]} = \frac{\text{Vektor [ng]} \cdot x}{F} \quad \text{mit} \quad F = \frac{\text{Vektorgro\ss e [kb]}}{\text{Fragmentgro\ss e [kb]}}$$

x = 3 für überhängende Enden
bzw. x = 5 für glatte Enden

Für eine Ligation mit Überhang wird die 3-fache molare Menge des zu ligierenden Fragments benötigt, bei glatten Enden wird die 5-fache molare Menge eingesetzt. 50-100 ng Vektor werden mit entsprechender Menge and DNA-Fragment und 400 U T4-DNA-Ligase in Ligase-Puffer bei 16°C über Nacht inkubiert und anschließend nach Herstellerangaben inaktiviert. Nach einer Ethanolfällung (3.3.9.4) und der Aufnahme der DNA in aqua dest. kann der Ligationsansatz mittels Elektroporation (3.4.1) in *E. coli* transformiert werden.

3.3.11 Kolonie-Blot

Der Kolonie-Blot dient dem Nachweis von spezifischen DNA-Sequenzen durch DNA-DNA-Hybridisierung direkt aus Bakterienkolonien. Auf eine gut bewachsene, frische Agarplatte wird eine Nylonmembran gelegt, mit dem anhaftenden Bakterienmaterial abgezogen und getrocknet. Durch das Auflegen der Membran auf mit Puffer getränktes Filterpapier wird die Membran äquibriert (10% SDS, 3 min), die DNA auf der Membran denaturiert (0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl, 5 min), neutralisiert (1,5 M NaCl und 0,5 M Tris, pH8, 5 min) und gewaschen (2 x SSC, 5 min). Nach dem Trocknen wird die DNA durch UV-Bestrahlung (Stratalinker[®] UV Crosslinker 1800, Stratagene, La Jolla, CA, USA) an der Membran fixiert. Verbleibendes Bakterienmaterial wird durch Tränken in 2 x SSC, Waschen (5 x SSC/0,5% SDS/1mM EDTA, 20 min, 50°C) und Trockenwischen entfernt. Nach dem Trocknen wird die Membran ein weiteres Mal mit UV-Licht bestrahlt.

Die DNA-Sonde für die Hybridisierung wird mittels PCR (3.3.1) aus einer Matrize mit dem zu detektierenden Bereich amplifiziert und anschließend mit dem DIG DNA

Labeling and Detection Kit (Roche) DIG-markiert. Nach Herstellerangaben erfolgt die Hybridisierung in Hybridisierungslösung (DIG Easy Hyb, Roche) im Hybridisierungs-ofen (Grant Instruments, Shepreth, UK) und anschließend die Detektion. Die Bindung von anti-DIG-AP-Konjugat (DIG DNA Labeling and Detection Kit Roche) an die DIG-markierten Sonden und die Dephosphorylierung des Chemolumineszenz-Substrats CSPD (Roche) durch die an den Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase erzeugt Chemolumineszenz, die nach Exposition der Membran auf Polaroid-Film sichtbar gemacht wird.

3.4 Genetische Manipulation von *E. coli*

3.4.1 Transformation durch Elektroporation

3.4.1.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Eine Schüttelkolbenkultur mit LB-Medium, die ggf. mit Antibiotikum supplementiert ist, wird aus einer ÜN-Kultur angeimpft und bis zu einer $OD_{600} \sim 0,6$ kultiviert (3.1.2) und anschließend 20 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien werden mehrmals in eiskaltem, sterilem aqua dest. mit abnehmendem Volumen gewaschen (1 Volumen, zweimal 0,5 Volumen, 0,2 Volumen, bezogen auf das Volumen der Ausgangskultur). Die Zentrifugationsschritte werden 15 min bei 4°C und 4000 rpm (Varifuge 3.0R, Heraeus Instruments, Hanau) durchgeführt. Zur Lagerung werden die Zellen in 10% Glycerin aufgenommen, à 40 µl aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Bei Laborstämmen haben sich das Wachstum der Kultur bei RT und eine sehr dichte Bakteriensuspension als vorteilhaft für die Transformationseffizienz erwiesen.

3.4.1.2 Elektroporation

Bei der Elektroporation wird durch das kurzfristige Anlegen eines elektrischen Feldes das Transmembranpotenzial der Bakterien verändert, wodurch wassergefüllte Poren in der Zellmembran erzeugt werden, die sich innerhalb von Millisekunden wieder schließen. In dieser Zeit kann DNA, die vorher mit der sehr dichten, salzfreien Bakteriensuspension vermischt wurde, von den Bakterien aufgenommen werden

(Neumann und Rosenheck, 1972). Durch die Poreninduktion verliert die Zellmembran jedoch an Semipermeabilität, zusätzlich kommt es zum Verlust intrazellulärer Bestandteile. Die Kultivierung in reichhaltigem Nährmedium nach der Elektroporation fördert die Regeneration der Bakterien.

Elektrokompetente Bakterien (3.4.1.1) werden auf Eis aufgetaut, mit 10-20 ng Plasmid-DNA versetzt und kurz gemischt. Nach mindestens 5 min Inkubation auf Eis wird die Bakteriensuspension luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette (Eurogentec, Köln; BioRad, München) überführt. Die Elektroporation erfolgt mit dem GenePulserII und dem Pulse Controller Plus (BioRad, München) in der Regel bei 2,5 kV, 400 Ω und 25 μ F. Die Bakteriensuspension wird danach sofort in vorgewärmtem SOC-Medium oder NZY+-Medium aufgenommen und vor dem Ausplattieren auf Selektivagar (LB-Agar mit Antibiotikum) mindestens eine Stunde bei 37°C und 200 rpm inkubiert.

3.4.2 Erzeugung von *E. coli*-Mutanten mittels Suizidvektor

Die Generierung von Mutanten mittels Suizidvektor erfolgt durch homologe Rekombination nach Konjugation eines Suizidvektors vom Donorstamm auf den Rezipientenstamm in einem zweistufigen Selektionsverfahren (Abbildung 3. 2).

Für die homologe Rekombination wird auf beiden Seiten der Zielsequenz eine etwa 500 bp lange Sequenz benötigt. Ein entsprechendes DNA-Fragment wird mit PCR amplifiziert (3.3.1) und nach einem Restriktionverdau (3.3.10) in den Suizidvektor pMHH1 kloniert. Der Ligationsansatz wird mittels Elektroporation (3.4.1.2) in *E. coli* sm10 λ pir transformiert und ein Klon mit korrektem Plasmid als Donorstamm für die nachfolgende Konjugation des Rezipienten eingesetzt. Der Donorstamm ist durch Expression des π -Proteins in der Lage, den Suizidvektor zu replizieren und durch Ausbildung von Fertilitäts-Pili an den Rezipienten zu übertragen. Nach der Konjugation in einen *E. coli*-Wildtypstamm bleibt die genetische Information des Plasmids nur nach genomischer Integration durch homologe Rekombination erhalten. Die entsprechenden Klone werden durch Wachstum auf LB/Amp-Agar selektiert. Anschließend erzeugen eine zweite homologe Rekombination und der Verlust des Plasmids die Mutante oder eine Reversion zum Wildtyp. Die Selektion findet über den Marker *sacB*, der das Enzym Levansucrase kodiert, auf Sucrose-Agar statt. Levansucrase wandelt Sucrose zu

dem für die Bakterien toxischen Zucker Levan um. Nur Klone ohne Plasmid wachsen gut auf Sucrose-Agar.

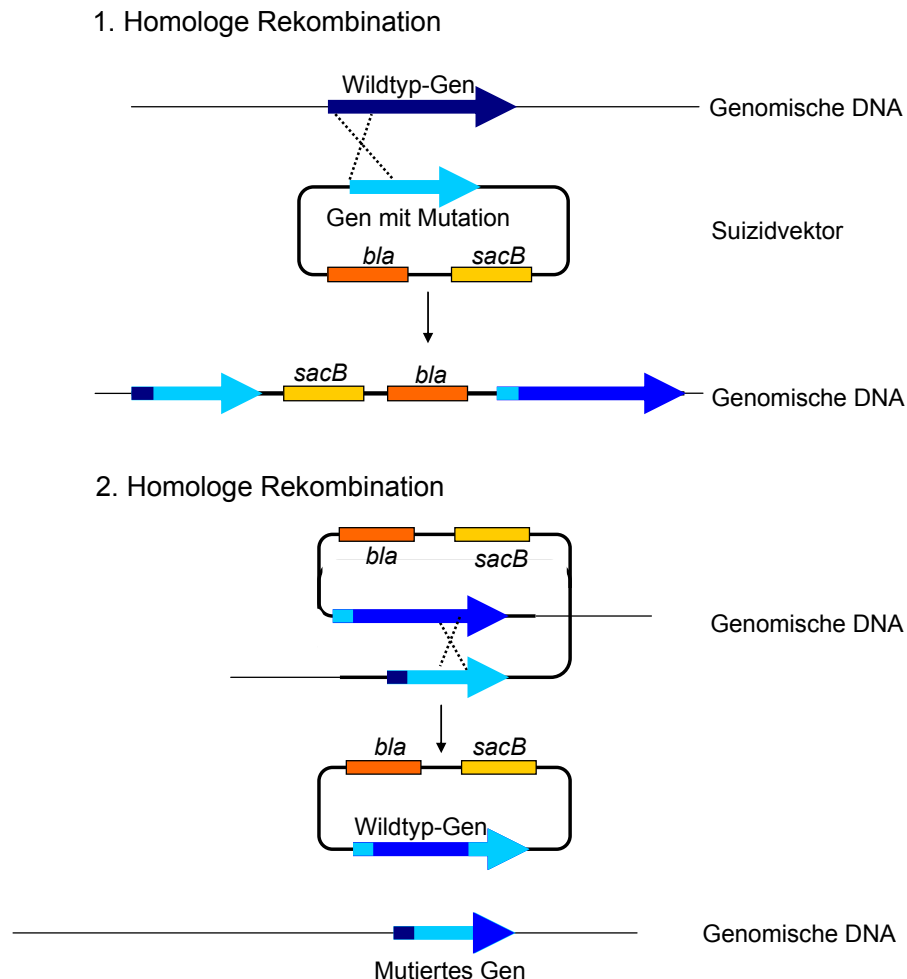


Abbildung 3. 2 Erzeugung von Mutationen durch homologe Rekombination mit einem Suizidvektor

Der Suizidvektor mit ori R6K kodiert die Enzyme β -Lactamase und Levansucrase. Bei der ersten homologen Rekombination wird der Vektor genomisch integriert, wodurch Ampicillinresistenz vermittelt wird. Nach der zweiten homologen Rekombination wachsen nur Klone ohne Vektor durch negative Selektion über Levansucrase.

Für die Konjugation werden Donor und Rezipient bis zu einer $OD_{600} \sim 0,5$ in LB-Medium bzw. LB/Amp-Medium kultiviert, zweimal gewaschen, im Verhältnis 1:2 gemischt und ÜN bei 37°C auf Blutagar inkubiert und am nächsten Tag in einer Verdünnungsreihe auf MacConkey/Amp-Agar ausplattiert. Die Ampicillin-resistenten Transkonjuganten unterscheiden sich durch Koloniemorphologie und Lactosespaltung vom Laktose-negativen Donorstamm. Nach mehreren Passagen auf MacConkey/Amp-

Agar wird eine Transkonjugante einige Stunden in LB-Medium ohne Selektionsdruck inkubiert und die zweite homologe Rekombination, die zum Verlust des Plasmids führt, eingeleitet. Anschließend wird eine Verdünnungsreihe auf Sucrose-Agar ausplattiert und über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wird die Inkubation bei 28°C für weitere 3-5 h fortgesetzt, bis sich „sucroseresistente“ Kolonien vom Hintergrund abheben. Diese werden ÜN bei 37°C in LB-Medium kultiviert. Anschließend wird die Ampicillinsensibilität getestet und die Mutation nachgewiesen, so dass zwischen den gewünschten Mutanten und dem Wildtyp unterschieden werden kann. Der Suizidvektor pMHH1 wird für die Erzeugung von Genaustauschmutanten, Deletionsmutanten und die Heilung von Plasmiden eingesetzt.

3.4.3 Narbenlose Deletionen im *E. coli*-Genom (Scarless Engineering)

Die Deletion großer genomischer DNA-Fragmente erfolgt nach der Methode von Feher et al. (Feher et al., 2008). Homologe Zielsequenzen werden in einen Suizidvektor mit temperaturempfindlichem *ori(ts)* kloniert. Das Plasmid wird über homologe Rekombination in die genomische DNA integriert. Die Induktion eines Doppelstrangbruchs durch die Meganuklease *IsceI*, deren 18 nt-Zielsequenz im Plasmid liegt, führt eine RecA-vermittelte Auflösung des intermediären Genomkonstrukts in Form einer zweiten homologen Rekombination und der Reparatur herbei. Das Ergebnis ist entweder eine Mutante oder eine Reversion zum Wildtyp. Es bleibt keine Fremd-DNA im Genom zurück. In Abbildung 3. 3 ist die Methode der narbenlosen Deletion schematisch dargestellt.

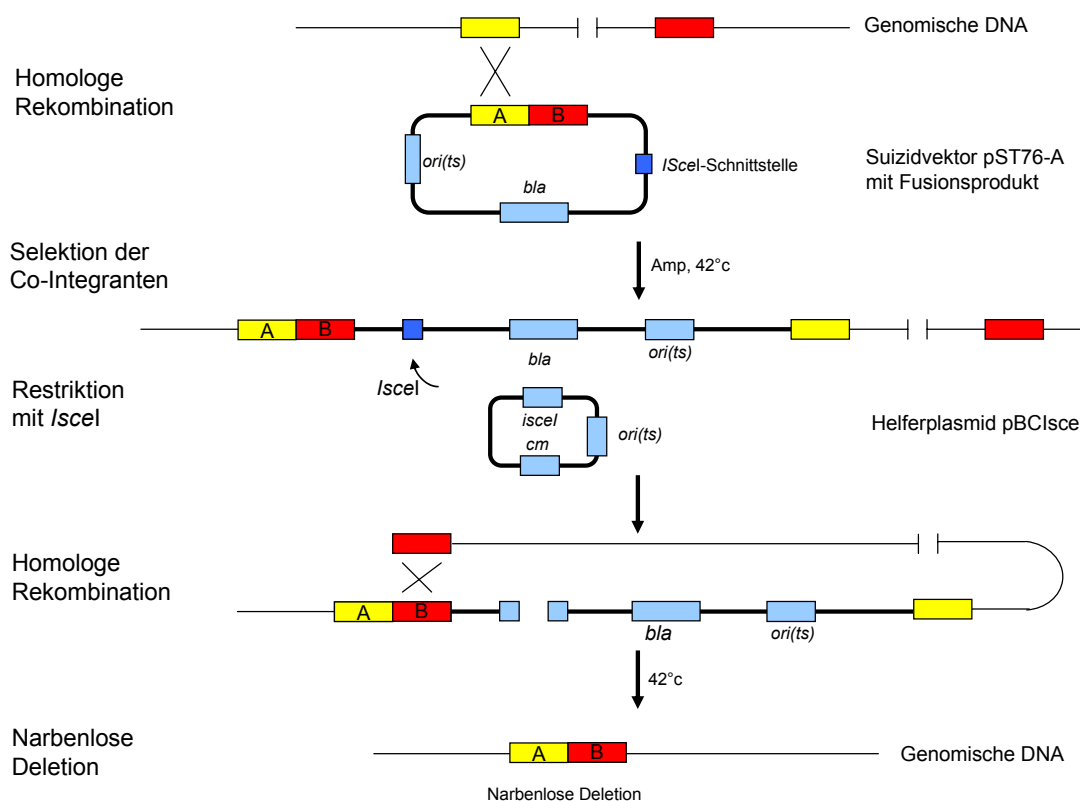


Abbildung 3.3 Schematische Darstellung einer narbenlosen Deletion (Scarless Engineering)

Nach Transformation des temperatursensitiven Plasmids pST76-A mit dem Fusionsprodukt aus den flankierenden Blöcken A und B des zu deletierenden Bereichs wird das Plasmid durch homologe Rekombination an Block A oder Block B in der Zielzelle genomisch integriert. Co-Integrianten werden durch das Wachstum bei 42°C selektiert. Nach der Transformation der Co-Integrianten mit dem Helferplasmid pBCIsce wird *I*SceI exprimiert. Das Enzym erzeugt in der integrierten Plasmidsequenz einen Doppelstrangbruch und induziert damit die zweite homologe Rekombination an Block B (oder Block A).

Im Genom werden 500-1000 bp lange, homologe Sequenzen links (Block A) und rechts (Block B) des zu deletierenden Bereichs gewählt. Die Blöcke werden mittels Fusions-PCR (3.3.2) amplifiziert und fusioniert. Das Fusionsprodukt wird über die Restriktionsschnittstellen in den Suizidvektor pST76-A ligiert und in *E. coli* MDS42 elektroporiert (3.4.1.2). Nach der Selektion auf LB/Amp-Agar ÜN bei 30°C wird das Plasmid präpariert (3.3.4) und mittels PCR und Restriktionsverdau kontrolliert. Das Plasmid wird in den zu deletierenden *E. coli*-Stamm elektroporiert. Nach Wachstum ÜN bei 30°C auf LB/Amp-Agar werden ausgewählte Kolonien auf frischem LB/Amp-Agar ausgestrichen und für weitere 2-6 Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubation ÜN bei 42°C. Gut wachsende, große Kolonien werden auf frischen LB/Amp-Agar überimpft und über Nacht bei 37°C bebrütet. Diese Kolonien haben das Plasmid genomisch integriert, wie mittels PCR mit den Vektorprimern Amp1 oder

Amp^r (8.2) in Kombination mit Primern stromaufwärts oder stromabwärts der Blöcke A und B im Genom nachgewiesen werden kann. Diese Co-integranen werden dann mit dem ebenfalls temperaturempfindlichen Helferplasmid pBCIsce transformiert (3.4) und auf LB/Cm-Agar bei 30°C selektiert. Die auf dem Plasmid pBCIsce kodierte *I*SceI-Meganuklease wird konstitutiv exprimiert und erzeugt an der *I*SceI-Schnittstelle des genomisch integrierten Plasmids einen Doppelstrangbruch. Dadurch wird die zweite homologe Rekombination stimuliert, die zur Generierung der Mutanten oder zu Revertanten (Wildtyp) führt. Die Deletion kann mit den Primern stromaufwärts und stromabwärts der Deletion nachgewiesen werden. Die anschließende Inkubation der Mutanten in LB-Medium ÜN bei 42°C führt zum Verlust beider Plasmide, was durch Wachstum einzelner Klone parallel auf LB/Amp-, LB/Cm- und LB-Agar überprüft wird. Deletionsmutanten, die nur noch auf LB-Agar wachsen, werden im VITEK2 (BioMerieux, Nürtingen) auf biochemische Parameter und Resistenzen überprüft. Der Deletionsbereich wird einschließlich der Blöcke A und B sequenziert und auf mögliche Mutationen überprüft. Wachstumskurven in MOPS-Minimalmedium (3.1.3) dienen der Kontrolle des Wachstums.

3.5 Säureresistenztest

Einige Bakterien sind in der Lage, sich auf eine plötzliche pH-Verschiebung in der Umgebung einzustellen, was auf die Aktivierung des alternativen Sigma-Faktors σ^S oder RpoS zurückzuführen ist. Diese Fähigkeit kann durch den Säureresistenztest überprüft werden. Dabei wird die Anzahl der überlebenden Bakterien in saurem Medium im Vergleich zu der Überlebensrate in Medium mit neutralem pH-Wert verglichen. Als Kontrollstämme werden der säureresistente Stamm EHEC 126814 und die säureempfindliche *rpoS*-Deletionsmutante *E. coli* MHH 126-5c (Tabelle 2. 4) mitgeführt.

Die zu testenden Bakterien werden in LB-Medium mit pH 7, das bei Bedarf mit einem Antibiotikum versetzt wird, über Nacht bei 37°C und 150 rpm kultiviert (3.1.1). Eine Hauptkultur mit LB-Medium, das ggf. mit Antibiotikum versetzt ist, wird aus der ÜN-Kultur angeimpft. Die Bakterien werden bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase bei OD₆₀₀ ~ 1,7 kultiviert. Je 10 µl dieser Hauptkultur werden in 10 ml gekühltes LB-

Medium pH 7 und 10 ml vorgewärmtes LB-Medium pH 2,5 überführt und gemischt. Die Proben in LB-Medium mit pH 2,5 werden weitere zwei Stunden bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Anschließend werden Verdünnungsreihen in sterilem PBS bis zu der Verdünnungsstufe 10^{-7} hergestellt und in Doppelbestimmung auf Müller-Hinton-Agar ausplattiert. Die Proben aus gekühltem LB-Medium pH 7 werden bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C gelagert, es werden die Verdünnungsstufen 10^{-3} und 10^{-4} in Doppelbestimmung auf Müller-Hinton-Agar ausplattiert. Nach der Inkubation der Platten ÜN bei 37°C werden die Kolonien ausgezählt, die KbE/ml errechnet und die Überlebensrate der Bakterien unter Säurestress im Vergleich zum Überleben in LB-Medium pH 7 in Prozent bestimmt.

Eine Modifikation des Säureresistenztests soll Aufschluss darüber geben, ob eine Adaptation an das saure Milieu die Säureresistenz verändert. Dazu werden die zu testenden Bakterienstämme aus der ÜN-Kultur in LB-Medium pH 7 in eine Hauptkultur mit LB-Medium pH 5,5 überimpft und bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Die weiteren Arbeitsschritte werden wie oben beschrieben durchgeführt.

3.6 Co-Kultivierung von pro- und eukaryotischen Zellen

3.6.1 Adhärenzassay

Der Adhärenzassay ist ein *in vitro* Testsystem, mit dem der Einfluss verschiedener *E. coli*-Stämme auf die Adhärenzeffizienz von EPEC an Darmepithelzellen bestimmt werden kann. Der Test wird nach Kleta et al. (Kleta et al., 2006) modifiziert.

Caco-2-Zellen werden mit einer Zellzahl von 10^5 Zellen/Well in 24-Well-Platten ausgesät und 4 Tage lang kultiviert, so dass die Zellen konfluente Monolayer ausbilden.

Aus Kulturen von *E. coli* MG1655, EcN, EPEC E2348/69 pBR322 und den zu testenden EcN-Mutanten werden in der exponentiellen Wachstumsphase (für EPEC: $OD_{600} \sim 2$; alle anderen: $OD_{600} \sim 1$) etwa 1-2 ml Kultur abzentrifugiert (5 min, 6000 g, RT; Microfuge 18, Beckman Coulter, Fullerton CA, USA), einmal in PBS gewaschen und in Zellkulturmedium aufgenommen. Mit Hilfe der zuvor angefertigten Wachstumskurven der verwendeten Stämme wird über die Bestimmung der OD_{600} die Lebendzellzahl der Bakteriensuspensionen in KbE/ml ermittelt. Aus einem Well wird die Zellzahl der Caco-2-Zellen bestimmt. In den übrigen Wells wird das Zellkultur-

medium durch frisches Medium ersetzt. Die Caco-2-Zellen werden zunächst mit einer MOI (multiplicity of infection) von 100 mit dem zu testenden Stamm für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS zur Entfernung nicht adhärenter Bakterien werden die Zellen für drei Stunden mit EPEC (MOI 100) kultiviert. Die Zellen werden im Anschluss daran zweimal mit PBS gewaschen, um nicht-adhärenente EPEC zu entfernen. Die Inkubation in frischem Zellkulturmedium wird für drei Stunden fortgesetzt. Es folgen zwei Waschschriffe mit PBS und die Lyse der Zellen mit 200 µl 0,1% Triton-X-100 in PBS. Nach kräftigem Mischen mit 800 µl LB-Medium je Well wird eine Verdünnungsreihe bis zur Verdünnungsstufe 10⁻⁶ angefertigt und die Verdünnungsstufen 10⁻⁴ bis 10⁻⁶ auf LB/Amp-Agar in Doppelbestimmung ausplattiert. Nach der Inkubation ÜN bei 37°C werden die KbE pro Agar-Platte ausgezählt und die KbE/ml errechnet. Als Adhärenzkontrolle werden Caco-2-Zellen nur mit EPEC inkubiert, die Inkubation mit dem zu testenden Stamm entfällt. Als Negativkontrollen werden Wells mit Caco-2 Zellen ohne Bakterien mitgeführt und EPEC ohne Zellen kultiviert, um die Adhärenz an die Zellkulturplatte zu testen. Die Adhäsionseffizienz der EPEC unter dem Einfluss der verschiedenen Stämme wird graphisch dargestellt. Alle Ansätze werden in Doppelbestimmung ausgeführt und in 3 unabhängigen Versuchen wiederholt. Die statistische Bewertung der Ergebnisse erfolgt mit dem Student's t-Test.

3.6.2 Invasionsassay

Der Invasionsassay ist ein *in vitro* Testsystem mit Caco-2-Zellen, mit dem der Einfluss verschiedener Bakterienstämme auf die Invasivität von *S. typhimurium* in Darmepithelzellen dargestellt werden soll. Der Test beruht auf den Veröffentlichungen von Kleta et al. (Kleta et al., 2006).

Caco-2-Zellen werden mit einer Zellzahl von 10⁵ Zellen/Well in 24-Well-Platten ausgesät und 4 Tage lang kultiviert (3.2), sodass die Zellen konfluente Monolayer ausbilden. Dann werden aus Kulturen der exponentiellen Wachstumsphase von *E. coli* K-12 MG1655, EcN, *S. typhimurium* und den zu testenden EcN-Mutanten (*E. coli*: OD₆₀₀ ~ 1; *S. typhimurium*: OD₆₀₀ ~ 2) etwa 1-2 ml Kultur abzentrifugiert (5 min, 6000 g, RT; Microfuge 18, Beckman Coulter, Fullerton CA, USA), einmal in PBS gewaschen und in Zellkulturmedium aufgenommen. Mit Hilfe der zuvor angefertigten

Wachstumskurven der verwendeten Stämme wird über die Bestimmung der OD₆₀₀ die Lebendzellzahl der Bakteriensuspensionen in KbE/ml ermittelt. Die Zellzahlbestimmung der Caco-2-Zellen erfolgt nach dem Waschen und Trypsinieren der Zellen aus einem Well, in den übrigen Wells wird das Zellkulturmedium durch frisches Medium ersetzt. Die Caco-2-Zellen werden zunächst mit einer MOI von 100 mit dem zu testenden *E. coli*-Stamm für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ co-kultiviert. Nach dreimaligem Waschen zur Entfernung extrazellulärer Bakterien werden die Zellen mit einer MOI von 100 mit *S. typhimurium* infiziert und eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Als Negativkontrolle werden Wells ohne Bakterien mitgeführt, die Positivkontrollen bestehen aus Wells, die nur mit *S. typhimurium* infiziert werden. Anschließend wird das Medium durch frisches, mit Gentamicin versetztes Zellkulturmedium ersetzt und die Zellen eine weitere Stunde inkubiert, wodurch extrazelluläre Bakterien abgetötet werden. Nach zwei Waschschritten mit PBS werden die Zellen durch Zugabe von 0,1% Triton-X-100 (200 µl/Well) lysiert, mit 800 µl LB-Medium versetzt und kräftig gemischt. Aus einer Verdünnungsreihe in PBS werden die Verdünnungsstufen 10⁻² bis 10⁻⁴ in Doppelbestimmung auf LB-Agar ausplattiert. Nach der Inkubation ÜN bei 37°C werden die KbE pro Agar-Platte ausgezählt und die KbE/ml errechnet. Alle Ansätze werden in Doppelbestimmung ausgeführt und in 3 unabhängigen Versuchen wiederholt. Die Invasivität der Salmonellen unter dem Einfluss der Stämme wird graphisch dargestellt. Die statistische Bewertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Student's t-Test.

3.6.3 Konfokalmikroskopie

Die Konfokalmikroskopie ist eine Variante der Licht- und Fluoreszenzmikroskopie, bei der virtuelle optische Schnitte durch ein Objekt erzeugt werden können. Das Anregungslicht wird in die Probe hineinfokussiert. Das Licht aus diesem Fokus wird durch das gleiche Objektiv auf eine Lochblende abgebildet und gelangt von dort auf einen Detektor. Anregungs- und Detektionsfokus liegen konfokal. In dieser Arbeit wird die Konfokalmikroskopie zur Darstellung der Lokalisation von Bakterien und Caco-2-Zellen nach Co-Kultivierung verwendet.

Caco-2-Zellen werden in 4-Well Lab-TekTM Chamber SlidesTM (Nunc) ausgesät. Der Invasionsassay (3.6.2) wird mit den fluoreszenzmarkierten Bakterien EcN pMW211

(DsRed-Expression) und *S. typhimurium* pGFP (GFP-Expression) durchgeführt. Die Zellen werden nach der Inkubation mit *S. typhimurium* nicht lysiert. Stattdessen wird der Objektträger von den Kammern befreit und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen werden 20 min in 3,7% Formaldehyd in PBS fixiert und anschließend luftgetrocknet. Zellmembranen und DNA werden mit Vybrant DiO und DAPI gefärbt. Nach dem Waschen mit PBS, dem Entsalzen in aqua dest. und Lufttrocknen werden die Zellen mit Slow Fade Gold (Molecular Probes/ Invitrogen) eingedeckt. Die Darstellung erfolgt am konfokalen Laserscanmikroskop LSM 510 (Carl Zeiss, Jena) und dem Bildbearbeitungsprogramm LSM Image Browser (Tabelle 2. 7).

3.6.4 Co-Kultur-Assay für Expressionsanalysen

Lovo-Zellen werden in Co-Kultur-Experimenten mit verschiedenen Bakterienstämmen kultiviert. Die Reaktion der Epithelzellen auf die Bakterien kann anhand der Änderungen der Genexpression untersucht werden.

Lovo-Zellen werden mit einer Zellzahl von $4\text{--}8 \cdot 10^5$ Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte ausgesät und etwa 4 Tage lang bis zur Bildung konfluenter Monolayer inkubiert. Die Zellen eines Wells werden zur Bestimmung der Zellzahl benutzt. Die konfluenten Lovo-Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen und in 3 ml Zellkulturmedium weiter kultiviert.

Die zu testenden Bakterien werden in Zellkulturmedium bis zur exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} \sim 0,5\text{--}1$) kultiviert. Mit Hilfe von Wachstumskurven werden die KbE/ml der Bakterienkulturen bestimmt. Die Wells werden mit einer MOI von 1 beimpft. Als Negativkontrollen für die Bestimmung der basalen Genexpression dienen Zellen, die ohne Bakterien kultiviert werden. Nach Zugabe der Bakterien werden die Co-Kulturen 6 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wird der Überstand entfernt und RNA isoliert (3.3.4.3). Pro Stamm und Versuch wird RNA aus 3 bis 4 Wells isoliert, gepoolt, in cDNA transkribiert (3.3.5) und für quantitative Realtime-PCR (3.3.6) eingesetzt.

3.7 Promotor-Reporter-Fusionsbibliothek (Promotorbank)

Die Promotor-Reporter-Fusionsbibliothek (Promotorbank) besteht aus Genomfragmenten von EcN, die in einen Vektor vor ein promotorloses *gfp-ova* kloniert werden. Befindet sich auf diesem Fragment genomischer DNA ein aktiver Promotor, so wird GFP exprimiert. Um EcN-spezifische Promotoren unter EcN-spezifischen Bedingungen identifizieren zu können, werden die Promotorbank-Plasmide in EcN transformiert. Die Regulation dieser Promotoren *in vivo* im Intestinaltrakt kann durch Experimente im Mausmodell untersucht werden.

3.7.1 Herstellung einer EcN-Promotorbank

Genomische DNA (3.3.4.1) von EcN wird im Ultraschallbad (Branson Sonifier S-450, Danbury, USA) mechanisch geschert. Dazu werden pro Ansatz ca. 10 µg genomische DNA mit Wasser auf ein Volumen von 150 µl aufgefüllt und 5 min bei 110-120 W beschallt. Die Fragmentierung wird mittels Agarosegelelektrophorese (3.3.7) überprüft. Nach der Auftrennung der Ansätze im 1,2% Agarosegel werden Fragmente einer Größe von 500 bis 800 bp aus dem Gel extrahiert (3.3.9.2) und die Konzentration der DNA im Agarosegel bestimmt (3.3.8.1). Die durch das Scheren überhängenden Fragmentenden werden durch Behandlung mit T4-DNA-Polymerase geglättet (3.3.10.2) und dephosphoryliert (3.3.10.3). Mittels Ethanolfällung (3.3.9.4) und Aufnahme in aqua dest. werden die Fragmente umgepuffert und in den Vektor pMW82 kloniert. Der Vektor wird dazu mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI linearisiert und über Gelextraktion (3.3.9.2) gereinigt. Die überhängenden Enden werden mit T4-DNA-Polymerase geglättet (3.3.10.2) und dephosphoryliert (3.3.10.3). Die Konstruktion der Promotorbank ist in Abbildung 3. 4 schematisch dargestellt.

Für die Promotorbank von EcN werden ca. $1 \cdot 10^6$ Klone gesammelt, sodass statistisch gesehen bei 5200 Genen und theoretisch ebenso vielen Promotoren eine mindestens 130-fache Abdeckung der Promotoren des EcN-Genoms gesichert ist. Die Klone werden mit LB-Medium von den Agarplatten abgeschwemmt und vereinigt. Die Suspension wird in zwei Portionen aufgeteilt. Nach dem Abzentrifugieren wird ein Pellet in Einfriermedium resuspendiert und in Aliquots bei -80°C gelagert. Aus dem zweiten Pellet werden die Plasmide isoliert (3.3.4) und in elektrokompetente EcN transformiert. Der Fragmentgehalt der Klone wird stichprobenartig mittels PCR

überprüft. Die Klone werden mit LB-Medium von den Platten abgeschwemmt und abzentrifugiert. Das Pellet wird in Einfriermedium aufgenommen und in Aliquots bei -80°C gelagert.

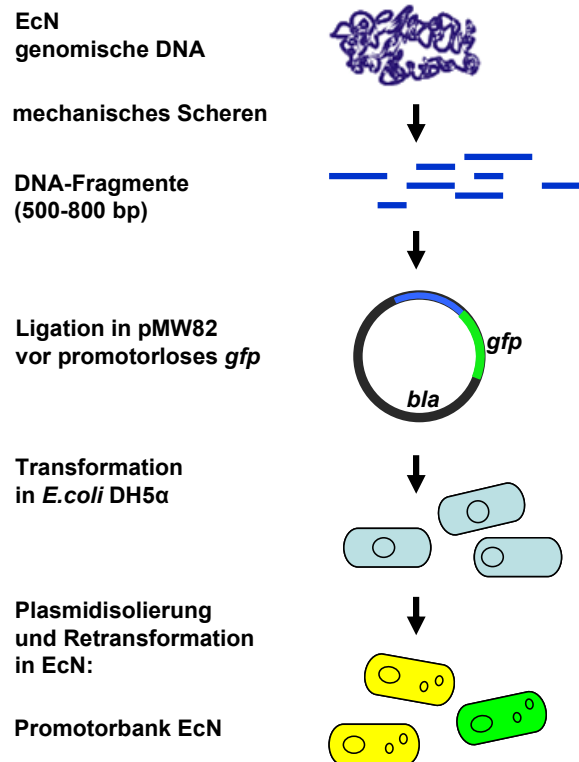


Abbildung 3. 4 Konstruktion einer Promotorbank

3.7.2 Sortierung und Identifizierung intestinal *in vivo* regulierter Gene

Für die Identifizierung von Promotorbank-Klonen mit intestinal *in vivo* aktiven Promotoren im Plasmid pMW82 werden Balb/c-Mäuse eingesetzt. Wie in Abbildung 3. 5 schematisch dargestellt ist, werden die Mäuse mit der Promotorbank EcN gefüttert und die Klone der Promotorbank EcN mit einem Durchflusszytometer anhand ihrer Fluoreszenz aus den Maus-Faeces sortiert. Dabei werden die fluoreszierenden Bakterien gesammelt. Nach einem Kulturschritt in LB/Amp-Medium werden die Bakterien erneut sortiert und die nicht fluoreszierenden Bakterien wieder an Mäuse verfüttert. Die anschließend mittels Fluoreszenz aus den Faeces der Mäuse sortierten Klone enthalten Plasmide mit intestinal *in vivo* aktiven Promotoren. Die genaue Durchführung der Experimente ist nachfolgend beschrieben.

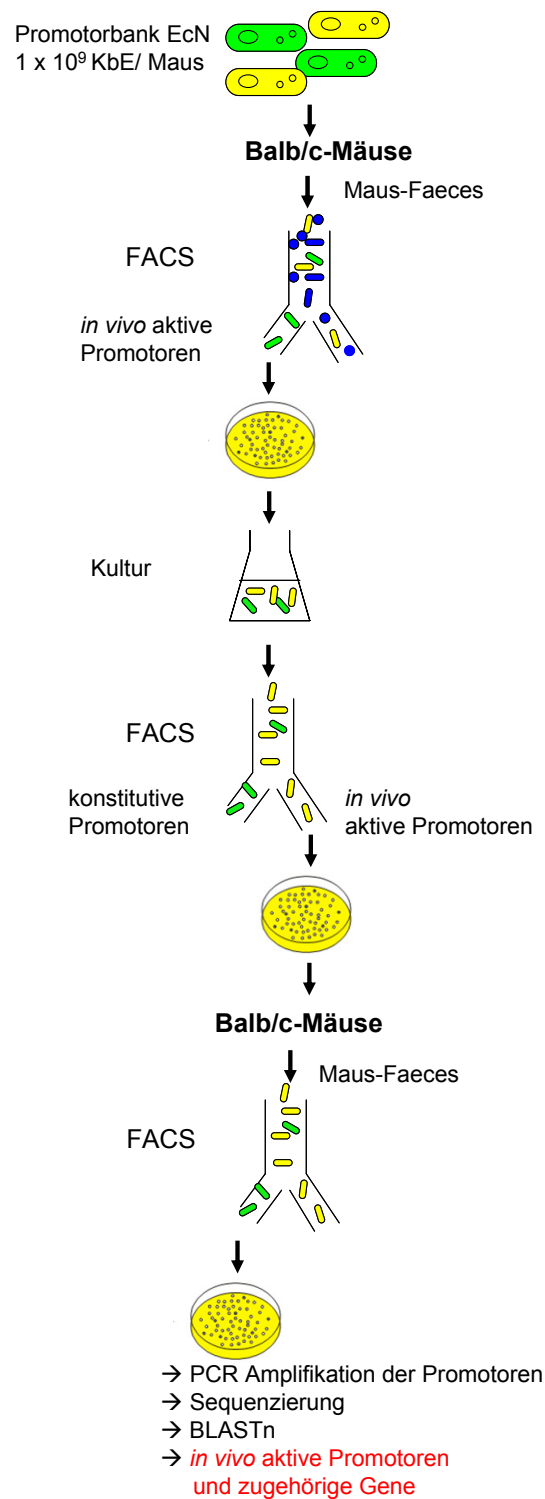


Abbildung 3. 5 Identifizierung von intestinal *in vivo* regulierten Genen mit der Promotorbank von EcN

Dargestellt ist das Schema zur Identifizierung von EcN-Promotoren und ihren korrespondierenden Genen, die in Balb/c-Mäusen aktiv sind, mittels Promotorbank von EcN und Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie (FACS) anhand der Fluoreszenz durch GFP-Expression.

Ein Aliquot der Promotorbank wird aufgetaut und 0,5 h in LB/Amp¹⁰⁰-Medium bei 37°C und 150 rpm zur Regeneration kultiviert. Anschließend werden die Bakterien in PBS gewaschen und die OD₆₀₀ photometrisch bestimmt. Die Suspension in PBS wird auf 1·10⁹ KbE/100 µl eingestellt. Die Anzahl der KbE/ml in der Suspension wird durch Ausplattieren einer Verdünnungsreihe auf LB/Amp¹⁰⁰-Agar und die Auszählung der Kolonien kontrolliert.

Fünf Balb/c-Mäuse im Alter von 8-16 Wochen erhalten jeweils 100 µl der Promotorbank-EcN-Suspension mittels Gavage (Sondenfütterung). Nach 24 Stunden werden die Mäuse getötet. Die Faeces aus dem gesamten Intestinaltrakt werden gesammelt und in PBS resuspendiert. Mit 30 µm-Filtern (MACS Pre-Separation Filter, Miltenyi-Biotec) werden grobe Bestandteile und Fasern abgetrennt. Das Filtrat wird in PBS verdünnt. Im Durchflusszytometer MoFlo (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) werden grün fluoreszierende Bakterien sortiert (Einstellungen: 70 µm Nozzle; Anregung: 488 nm, 1000 mW; Trigger über SSC; Sortierungsrate: ca. 60.000 Zellen/s). Zur Regeneration wird die sortierte Probe mit SOC-Medium versetzt und 0,5 h bei 37°C und 150 rpm inkubiert und auf LB/Amp¹⁰⁰-Agar ausplattiert.

Die Klone werden von den Agarplatten abgeschwemmt, in Einfriermedium aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Ein Aliquot (etwa 100 µl) wird dann in einem Erlenmeyerkolben in LB/Amp¹⁰⁰-Medium bis zur exponentiellen Wachstumsphase (OD₆₀₀ ~ 0,9) kultiviert. Anschließend werden die Bakterien in PBS gewaschen, resuspendiert und mit dem MoFlo sortiert, um Promotoren von konstitutiv exprimierten Genen auszusortieren. Dabei werden sowohl die GFP-exprimierenden als auch die nicht fluoreszierenden Bakterien gesammelt. Nach der Sortierung erfolgt die Regeneration in SOC-Medium und das Ausplattieren auf LB/Amp¹⁰⁰-Agar. Die Klone werden von den Platten abgeschwemmt und in Einfriermedium bei -80°C gelagert.

Die nach dem Kulturschritt nicht fluoreszierenden EcN tragen Plasmide, die *in vivo* regulierte Promotoren beinhalten. Zur Testung und zum Aussortieren von Plasmiden ohne DNA-Fragment aus EcN werden diese Promotorbank-Klone ein weiteres Mal an Mäuse verfüttert und fluoreszierende EcN sortiert. Die Vorgehensweise entspricht dabei der ersten Fütterung und Sortierung.

Aus den Klonen dieser Sortierung werden mittels PCR mit den Primern pMW82-1/pMW82-2 oder pMW82-3/pMW82-4 die EcN-Fragmente aus pMW82 amplifiziert

und mit dem Primer pMW82-1 ansequenziert (3.3.3). Die Identifizierung der Promotorsequenzen im EcN-Genom mittels BLASTn (Altschul et al., 1997) gibt Hinweise auf die korrespondierenden Gene.

Der Versuch wird sowohl mit konventionellen Mäusen, die eine intestinale Mikroflora ohne pathogene Bakterien aufweisen, als auch mit gnotobiotischen (keimfreien) Balb/c-Mäusen durchgeführt.

3.8 *lux*-Reportergen-Assay

Das für den Gebrauch in Gram negativen Bakterien optimierte *luxCDABE*-Operon aus *Photobacterium luminescens* (Winson et al., 1998) kodiert einen Fettsäurereduktase-Komplex (*luxCDE*), der in die Bildung eines Fettsäurealdehyds involviert ist. Dieses dient als Substrat für das Enzym Luciferase, das von *luxAB* kodiert wird. Luciferase setzt unter Verbrauch von Sauerstoff das gebildete Fettsäurealdehyd um, wobei Licht emittiert wird.

Zur Testung von Promotoren wird das *lux*-Operon als Reporter eingesetzt. Promotoren werden vor das *lux*-Operon kloniert und die so entstandenen Plasmide in EcN transformiert. Die Biolumineszenzentwicklung wird über die Wachstumszeit der Bakterien beobachtet. Dazu werden aus ÜN-Kulturen von EcN mit pDS17 als Negativkontrolle und pDS15 bzw. pDS21 als Positivkontrolle sowie EcN mit pDS19 bis pDS26 Hauptkulturen (LB-Medium oder MOPS-Minimalmedium mit Ampicillin) angeimpft und bei 37°C und 200 rpm inkubiert. In Zeitintervallen wird 1 ml Kultur in eine 24-Well-Platte pipettiert und die Biolumineszenz im BioImager LAS3000 (Fujifilm, Düsseldorf) quantifiziert. Die optische Dichte der Kulturen zu diesem Zeitpunkt wird photometrisch bestimmt. Die Auswertung erfolgt durch Import und Bearbeitung der Daten in Microsoft Excel. Nach Abzug des Leerwerts (LB-Medium) erfolgt die graphische Darstellung der Daten.

Die Aktivität der Promotoren *in vivo* im Gastrointestinaltrakt wird im Mausmodell getestet. Ausgewählte Promotorkonstrukte in EcN werden oral mittels Gavage Balb/c-Mäusen appliziert. Jede Maus erhält $1 \cdot 10^9$ KBE in 100 µl PBS. Nach einigen Stunden werden die Mäuse anästhesiert und die Biolumineszenz *in vivo* detektiert (Xenogen IVIS 200; Xenogen Corp., Alameda, CA, USA). Nach der letzten Messung werden die Mäuse getötet und die Därme präpariert. So kann hier ebenfalls die Biolumineszenz

gemessen werden. Durch Überlagerung der Bilder können die lumineszierenden Bakterien in der Maus lokalisiert werden.

3.9 Genomsequenzierung und Annotation

3.9.1 Das Genom von EcN

Die Sequenzierung des Genoms wurde in der Abteilung Genomanalyse des HZI (Braunschweig) mit automatischer Hochdurchsatz-Sequenzanalyse auf der Grundlage von Shotgun-DNA-Bibliotheken aus genomischer DNA von EcN mit MegaBACE 1000 und 4000 (Molecular Dynamics, Albertville, USA), ABI 377 (Applied Biosystems, Darmstadt) und Long Reader 4200 (LI-COR, Bad Homburg) durchgeführt. Die Rohsequenz wurde mit Phrap (<http://www.phrap.com>) zusammengesetzt. Die daraus resultierenden 95 Contigs wurden mit dem Programm IdentiCS (Sun und Zeng, 2004) bearbeitet, wodurch direkt aus der Rohsequenz die kodierenden Sequenzen (CDS) ermittelt werden konnten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Genomsequenz automatisch und manuell mit dem Annotationsprogramm GenDB 2.4 (www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software) annotiert. Die Kontrolle und Benennung der automatisch annotierten Gene erfolgt durch den Vergleich mit Datenbanken auf der Ebene der Aminosäuresequenz mittels BLASTp oder der Nukleotidsequenz mittels BLASTn (Altschul et al., 1997). Einzelne Sequenzabschnitte werden mit PCR überprüft und fehlerhafte Sequenzen verbessert.

3.9.1.1 Die Plasmide pMUT1 und pMUT2 von EcN

Das EcN-spezifische Plasmid pMUT2 wurde wie die genomische DNA mit Shotgun-Technik sequenziert und unklare Bereiche mittels PCR überprüft. pMUT1 wurde durch Primerwalking ausgehend von den Primern Muta5 und Muta6 sequenziert (Blum-Oehler et al., 2003). Die Bearbeitung der Annotation erfolgt automatisch und manuell mit dem Annotationsprogramm GenDB 2.4 (Tabelle 2. 7).

3.10 Vergleich von *E. coli*-Genomen

3.10.1 Berechnung des Kerngenoms und stammspezifischer Gene

Orthologe Proteine werden als reziprok beste Übereinstimmung durch Vergleiche von BLASTp und TBLASTn identifiziert. Die kodierende Sequenz wird als ortholog eingestuft, wenn über 50% der Aminosäuresequenz zu mehr als 50% der abgefragten Sequenz identisch ist. Die Größe des Kerngenoms wird durch nichtlineare Regression bewertet (Tettelin et al., 2005). Gene mit unter 50% Homologie über 50% der Aminosäuresequenz, die nur in einem Stamm vorhanden sind, gelten als stammspezifische Gene.

3.10.2 Phylogenetische Analyse

Die berechneten *E. coli*-Kerngenome werden mit MUSCLE (Edgar, 2004) einem Homologievergleich unterzogen. Anschließend werden diese Regionen mit GBLOCKS (Castresana, 2000) überarbeitet und stark abweichende Regionen entfernt. Die homologen Bereiche werden in einem großen Homologievergleich konkateniert und der phylogenetische Stammbaum daraus mit PHYLIP (Felsenstein, 1981) erstellt.

Sowohl die Berechnung des Kerngenoms und die Identifizierung stammspezifischer Gene als auch die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums erfolgte an der Universität Bielefeld (CeBiTec, Bioinformatics Resource Facility, Universität Bielefeld).

3.10.3 Homologievergleich vollständiger Genome

Homologievergleiche von annotierten *E. coli*-Genomen werden mit Mauve 2.2.0 erstellt (Darling et al., 2004). Orthologe Regionen, Rearrangements und inverse Regionen werden dabei erkannt und in der grafischen Darstellung als farbige Blöcke (LCB, locally collinear blocks) abgebildet.

3.11 Tierversuche

Alle Tierexperimente werden unter Mithilfe und Anleitung der Mitarbeiter des Zentralen Tierlabors (ZTL) der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Sowohl die konventionellen (SPF) als auch die gnotobiotischen Balb/c-Mäuse stammen aus der Zucht des ZTL. Die Tierversuche werden in Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz und den Richtlinien des Rates der Europäischen Gemeinschaft zum Schutz der Tiere, die für experimentelle Zwecke eingesetzt werden, und der Genehmigung des Tierschutzbeauftragten und dem Beratungsausschuss der Medizinischen Hochschule Hannover sowie der Bezirksregierung Hannover durchgeführt.

3.12 Sicherheit

Chemikalien werden entsprechend den R- und S-Sätzen verwendet. Lösungsmittelrückstände werden in speziell gekennzeichneten Behältern gesammelt und ordnungsgemäß entsorgt. Biologisches Material und kontaminierte Arbeitsmaterialien werden vor der fachgerechten Entsorgung und Reinigung autoklaviert. Flüssigkulturen mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO) der Sicherheitstufe S2 werden entsprechend der Laborordnung zuerst mit Dismozon (4%) oder Incidin (1%) inaktiviert und anschließend ebenfalls autoklaviert.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse des Genoms von EcN

4.1.1 Das annotierte Genom

Das EcN-Genom besteht aus 5.053.341 bp. Der GC-Gehalt beträgt 50,58%. Durch die automatische und manuelle Annotation sind 5082 Gene, 84 tRNA-Transkripte und 22 rRNA-Transkripte identifiziert worden.

Das Genom in zirkulärer Form ist in Abbildung 4. 1 dargestellt. Der Vorwärtsstrang und der Komplementärstrang enthalten etwa gleich viele Gene (Ring 2 und 4). Die Gene des Kerngenoms (Ring 3 und 5) sind über beide Stränge verteilt. Einige größere Bereiche, die keine Gene des Kerngenoms enthalten, entsprechen den in dieser Arbeit identifizierten genomischen Inseln und Prophagen-Regionen (Tabelle 4. 2), bei denen der GC-Gehalt von dem mittleren GC-Gehalt des Genoms zum Teil deutlich abweicht (Ring 9). Sie sind häufig mit tRNAs assoziiert, die in Ring 7 eingezeichnet sind. Die übereinstimmenden Genombereiche von EcN mit dem uropathogenen Stamm *E. coli* CFT073 sind in Ring 8 dunkelgrün markiert. Der Sequenzvergleich von EcN und *E. coli* CFT073 bestätigt die bereits beschriebene nahe Verwandtschaft dieser beiden Stämme (Grozdanov et al., 2004). Eine genaue Analyse dazu ist unter Punkt 4.1.5 zu finden.

Mit Hilfe des GC-Skew (Ring 10) kann der Replikationsursprung *oriC* (origin of replication) und der Terminus *terC* (terminus of replication) ermittelt werden (Freeman et al., 1998; Lobry, 1996). Der GC-Skew stellt eine Funktion dar, die aufgrund der Ungleichverteilung von G- und C-Basen im Vorwärtsstrang bzw. Rückwärtsstrang um eine Achse oszilliert und am Replikationsursprung bzw. am Terminus das Vorzeichen wechselt. Der *oriC* von EcN liegt in der intergenischen Region von *gidA* und *mioC* (ECN5144 und ECN5145) im Bereich 5011764-5012141 bp und ist im GC-Skew durch den Wechsel der oszillierenden Kurve von der äußeren auf die innere Seite des Zirkels dargestellt.

Zur Identifizierung der kodierenden Sequenzen (CDS) und wird jedem CDS eine Kennzeichnung, der sogenannte Locus tag, zugeordnet. Die CDS umfassen dabei alle

Transkripte, während offene Leseradter (ORFs) nur die Protein-kodierenden Gene bezeichnen. Die Durchnummerierung des EcN-Genoms beginnt mit dem Gen *dnaA*, das den Locus tag ECN0001 erhält. Das komplette EcN-Genom wird nach der Veröffentlichung (Schmidt et al., Manuskript in Vorbereitung) in einer Datenbank frei zugänglich sein.

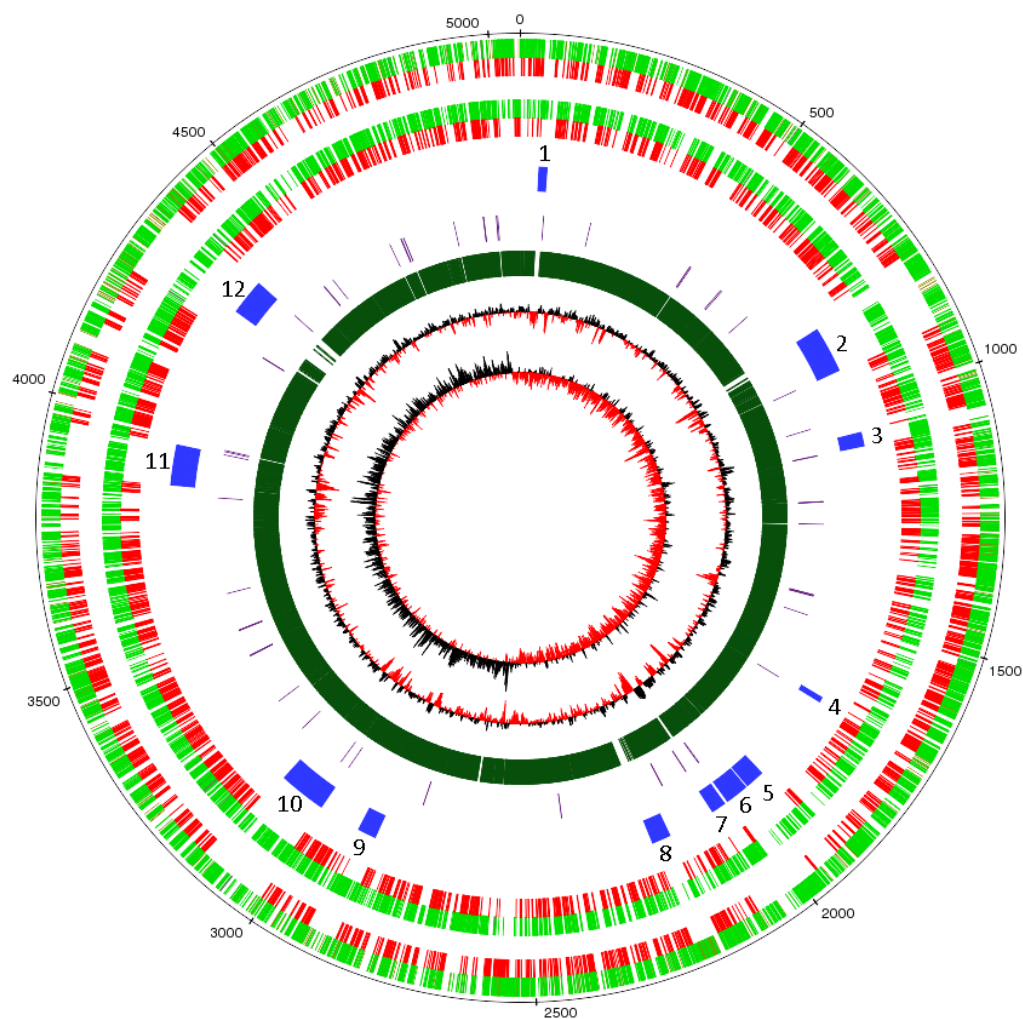


Abbildung 4. 1 Zirkuläre Darstellung des Genoms von EcN

Der äußere Ring enthält die Skalierung in kb. Im zweiten Ring sind die Gene des Vorwärtsstrangs grün dargestellt. Ring 3 zeigt die darin enthaltenen Gene des Kerngenoms in rot. Ring 4 und Ring 5 zeigen entsprechend die Gene des komplementären Strangs in grün mit den Genen des Kerngenoms in rot. Der sechste Ring gibt die Lage der genomischen Inseln und Prophagen an (1-3, 5-7, 10-12: $GI_{EcN}I-IX$; 4, 8, 9: Prophagen $\Phi I-III$). tRNAs sind im Ring 7 eingezeichnet. In dunkelgrün (Ring 8) dargestellt sind die übereinstimmenden Genomregionen mit *E. coli* CFT073. Die beiden inneren Ringe zeigen den GC-Gehalt (Ring 9) und den GC-Skew (Ring 10). Grafik: GenDB 2.4

4.1.2 Die kryptischen Plasmide pMUT1 und pMUT2

Die zwei stammspezifischen Plasmide von EcN 1917, pMUT1 und pMUT2, wurden ebenfalls sequenziert und annotiert. Sie sind in Abbildung 4. 2 dargestellt. pMUT1 ist 3173 bp groß und weist einen GC-Gehalt von 46,9% auf. Es kodiert 2 Gene. Das Plasmid pMUT2 besteht aus 5514 bp mit einem GC-Gehalt von 46% und kodiert 8 Gene. Der GC-Gehalt der beiden Plasmide ist niedriger als der GC-Gehalt des EcN-Chromosoms und ist ein Hinweis auf horizontal erworbene Fremd-DNA. Die beschriebene Homologie der Plasmide pMUT1 zu dem Plasmid pCRP3 von *Citrobacter rodentium* und pMUT2 zu 3,5 kb von 5,8 kb des Plasmids pUB6066 von *Plesiomonas shigelloides* bestätigt diese Vermutung (Blum-Oehler et al., 2003).

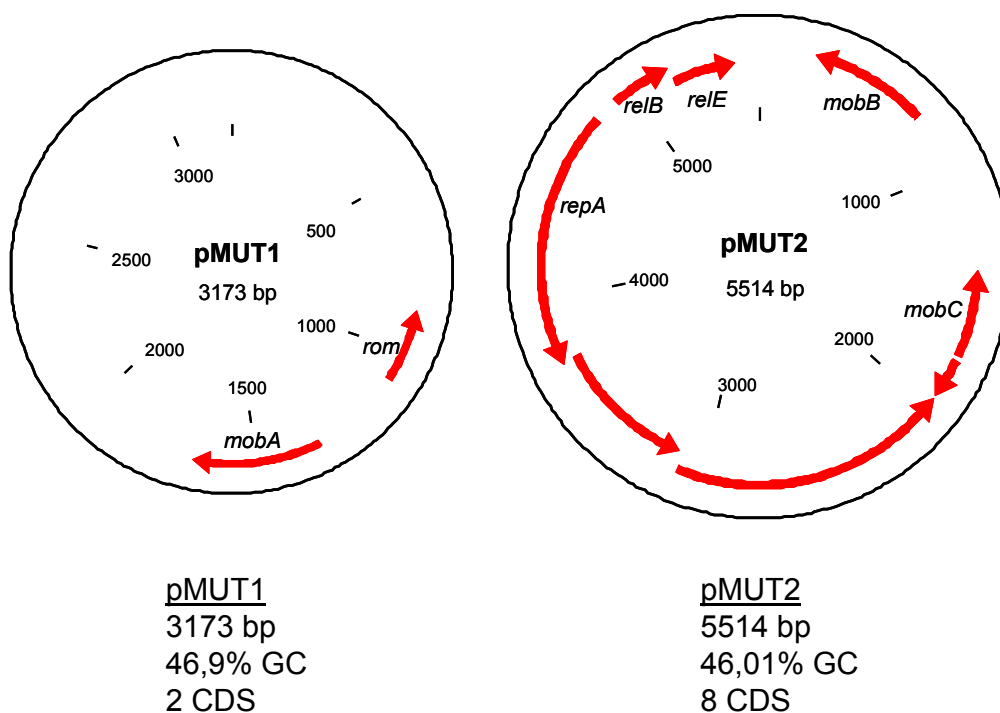


Abbildung 4. 2 Grafische Darstellung der stammspezifischen Plasmide von EcN

Die Nachsequenzierung der Plasmide im Zusammenhang mit der Genomsequenzierung von EcN zeigt jedoch Abweichungen zu bisherigen Publikationen. Die Länge und Sequenz von pMUT1 stimmt mit der Veröffentlichung von Blum-Oehler et al. (Blum-Oehler et al., 2003) überein, jedoch nicht mit den unter den Datenbank-Nummern A84793 und A95447 zugänglichen Sequenzen der Länge von 3177 bp. pMUT2 ist in der Nachsequenzierung mit 5514 bp kürzer als die bisher veröffentlichten Sequenzen

(Datenbankeintrag A84794 und A95448: jeweils 5552 bp; (Blum-Oehler et al., 2003): 5526bp). Die unterschiedlichen Sequenzlängen und die Benutzung verschiedener Computerprogramme zur automatischen Annotation führen teilweise zur Identifizierung anderer CDS. In der aktuellen Annotation kodiert pMUT1 die Gene *rom*, ein RNA I Modulator (regulatorisches Protein Rop), und *mobA*, ein Mobilisierungsprotein. pMUT2 enthält CDS für *mobB* und *mobC*, die ebenfalls Mobilisierungsproteine kodieren. Weiterhin gibt es CDS für ein Replikationsprotein A (*repA*), die Toxin-Antitoxingene *relB* und *relE* und drei hypothetische Proteine, die nur geringe Homologie zu bisher bekannten Genen und Proteinen aufweisen und deshalb bezüglich möglicher stammspezifischer Aktivitäten von Interesse sind.

4.1.3 Vergleich des EcN-Genoms mit 13 weiteren *E. coli*-Genomen

Bisher sind 13 vollständig sequenzierte und annotierte *E. coli*-Genome veröffentlicht worden. Zu ihnen gehören drei *E. coli* K-12 Laborstämme, zwei kommensale Humanisolate, sieben pathogene *E. coli* sowie ein Umweltisolat (Tabelle 4. 1). Durch den Vergleich der Genomsequenzen und ORFs bzw. CDS können Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Stämme in Bezug auf EcN untersucht werden. Auf der Grundlage dieser *E. coli*-Genome werden 2725 Gene identifiziert, die in allen 14 Genomen vorhanden sind und jeweils in über 50% der Aminosäuresequenz zu über 50% identisch sind. Sie bilden das Kerngenom, das vor allem Gene umfasst, die für Basisfunktionen der Zellen wie Stoffwechsel und Zellteilung zuständig sind. Die übrigen Gene werden dem flexiblen Genpool zugeordnet und lassen sich in stammspezifische Gene und Gene, die in mindestens einem weiteren *E. coli*-Stamm vorkommen, einteilen.

Gene in EcN, die auch in einigen anderen Stämmen vorhanden sind, kodieren zum Beispiel Typ II-Sekretionssysteme (*gspACDEFGHIKLMO* ECN0445-ECN0456, ECN0851-ECN0861), Phosphotransferase-Systeme (ECN0068-ECN0071, ECN2560-ECN2565) und verschiedene Fimbrien (*fim* ECN4405-ECN4414, *foc* ECN3130-ECN3138).

EcN besitzt 121 stammspezifische Gene (Tabelle 4. 1; 8.3). Einige sind in die Kapselbiosynthese involviert, weitere Gene kodieren sezernierte Proteine oder Proteine mit regulatorischen Eigenschaften, wie die Sequenzanalyse vermuten lässt. Mehr als die Hälfte der EcN-spezifischen Gene kodieren hypothetische Proteine, deren Funktion

bisher noch nicht bekannt ist. Die meisten der EcN-spezifischen Gene sind in Bereichen des Genoms lokalisiert, die als genomische Inseln identifiziert wurden (4.1.4).

Die 14 *E. coli*-Stämme (Tabelle 4. 1) unterscheiden sich deutlich in der Genomgröße und in der Gesamtzahl ihrer ORFs. Der GC-Gehalt ist dabei annähernd gleich. Auch die Anzahl der rRNA-Transkripte ist identisch. Diese sind in 7 konservierten Operons organisiert, deren charakteristischer Aufbau aus 16S, 23S und 5S rRNA und einer oder mehreren tRNAs besteht, die als ein Primärtranskript abgelesen und prozessiert werden. Ein oder zwei zusätzliche 5S rRNA-Transkripte sind vorhanden (Knippers R., 2001). Die Anzahl der tRNA-Transkripte variiert dagegen zwischen 81 bei *E. coli* 536 und 105 bei *E. coli* O157:H7 Sakai. EcN hat mit 84 tRNAs eine vergleichsweise geringe Anzahl an tRNA-Transkripten vorzuweisen. Die Untersuchung der Gene im Bereich der Transkripte ergibt, dass hier häufig Transposasen und IS-Elemente zu finden sind. Die Unterschiede sind demnach durch Insertionen und Deletionen im Rahmen des horizontalen Gentransfers (4.1.4) entstanden.

Bei der Betrachtung des prozentualen Anteils des Kerngenoms und der stamm-spezifischen Gene in Bezug auf die Gesamtzahl der ORFs der einzelnen Stämme (ohne Berücksichtigung stammspezifischer Plasmide) zeigt sich auch hier eine breite Verteilung (Tabelle 4. 1): Bei den K-12 Laborstämmen hat das Kerngenom einen Anteil von über 61% am Gesamtgenom, während die stammspezifischen ORFs deutlich unter 2% bleiben. Die Kommensalen weisen ebenfalls ein Kerngenom von über 61% auf, sie besitzen jedoch einen größeren Anteil an stammspezifischen Genen. Bei EcN, den pathogenen Stämmen und dem Umweltisolat gehören $\leq 61\%$ der Gene zum Kerngenom. Die Größe der Genome und die Anzahl der darin identifizierten ORFs variiert stark. So haben die EHEC-Stämme ein sehr großes Genom. Das Kerngenom hat dadurch einen Anteil von ca. 50% bei über 6% stammspezifischen Genen. Die ORFs in EcN gehören zu 53,6% dem Kerngenom an. Nur 2,4% der ORFs sind stammspezifisch.

Tabelle 4. 1 Allgemeine Charakteristika von EcN und 13 weiteren *E. coli*-Genomen

<i>E. coli</i> Stamm	Serotyp	Beschreibung	Genom- größe [bp]	ORFs	tRNA	rRNA	GC- Gehalt [%]	Kern- genom ORFs	Kern- genom [%] ^a	Stamm- spezif. ORFs	Stamm- spezif. ORFs [%] ^b	Anzahl Plasmide	Referenz	Genbank- Nr.
Nissle 1917	O6:K5:H1	Probiotikum	5053341	5082	84	22	50,58	2725	53,6	121	2,4	2	diese Arbeit	
CFT073	O6:K2:H1	UPEC	5231428	5378	89	21	50,47	2725	50,7	227	4,2	0	(Welch et al., 2002)	NC_004431
UTI98	O6:K1:H?	UPEC	5065741	5066	88	22	50,6	2725	53,8	171	3,4	1	(Chen et al., 2006)	NC_007946
536	O6:K15:H31	UPEC	4938920	4685	81	22	50,52	2725	58,2	291	6,2	0	(Brzuszkiewicz et al., 2006)	NC_008253
APEC 01	O1:K1:H7	APEC	5082025	4467	94	22	50,55	2725	61	174	3,9	2	(Johnson et al., 2007)	NC_008563
MG1655	OR:H48:K-	Laborstamm	4639675	4242	89	22	50,79	2725	64,2	34	0,8	0	(Blattner et al., 1997)	NC_000913
W3110	OR:H48:K-	Laborstamm	4646332	4336	86	22	50,8	2725	62,8	59	1,4	0	(Hayashi et al., 2006)	AC_000091
DH10B	kA	Laborstamm	4686137	4190	86	22	50,78	2725	65	42	1	0	(Durfee et al., 2008)	NC_010473
HS	O9	Kommensale	4643538	4383	88	22	50,82	2725	62,2	189	4,3	0	-	NC_009800
ATCC8739	kA	Kommensale	4746218	4180	87	23	50,87	2725	65,2	107	2,6	0	-	NC_010468
EDL933	O157:H7	EHEC	5528445	5346	98	22	50,38	2725	51	323	6	1	(Perna et al., 2001)	NC_002655
O157:H7 Sakai	O157:H7	EHEC	5498450	5360	105	22	50,54	2725	50,8	353	6,6	2	(Hayashi et al., 2001)	NC_002695
E 24377A	O139:H28	ETEC	4979619	4755	91	21	50,62	2725	57,3	410	8,6	6	-	NC_002695
SMS-3-5	kA	Umweltisolat	5068389	4742	90	22	50,5	2725	57,5	339	7,1	4	-	NC_010498

kA : keine Angaben

a : Prozentualer Anteil der ORFs des Kerngenoms bezogen auf die Gesamt-ORFs

b : Prozentualer Anteil der Stamm-spezifischen ORFs bezogen auf die Gesamt-ORFs

Die weitere Entwicklung des Kerngenoms und der stammspezifischen Gene in Bezug auf die Anzahl der zugehörigen Gene durch weitere sequenzierte *E. coli*-Genome lässt sich anhand mathematischer Berechnungen abschätzen. Ausgehend von einem Vergleich der möglichen Kombinationen aller Genome wird die Anzahl der Gene des Kerngenoms bzw. der stammspezifischen Gene berechnet. Die resultierende Anzahl der Gene für die jeweiligen Kombinationen wird gemittelt und im Koordinatensystem aufgetragen (Abbildung 4. 3). An diese ermittelten Werte werden die weiteren Kurven, sogenannte Zerfallskurven, angepasst. Die Kurvenanpassung und das 95%-Konfidenzintervall werden mit einem entsprechenden Statistikprogramm erstellt.

Die zugehörige Funktion lautet:

$$f(x) = k \cdot \exp(-x/t) + p$$

(k = Skalierungsfaktor, t = Steigung der Kurve, p = Abstand von der x-Achse (Wert, gegen den die Funktion tendiert), x = Anzahl der Gene des Kerngenoms oder der stammspezifischen Gene)

Die in Abbildung 4. 3 dargestellten Diagramme zeigen, dass sich durch weitere vollständig sequenzierte *E. coli*-Genome, die in die Berechnung einbezogen werden, die Größe des Kerngenoms und die Anzahl der EcN-spezifischen Gene bei gleichbleibenden Algorithmen nur noch geringfügig verändern werden. In der grafischen Darstellung der Kerngenomgröße im Verhältnis zur Anzahl der Genome (Abbildung 4. 3 A) liegt die Kerngenomgröße derzeit zwischen 2700 und 3000 Genen und wird sich in diesem Bereich einpendeln. Der Durchschnitt liegt mit 2850 Genen schon über der berechneten Kerngenomgröße, eine weitere starke Abnahme ist daher kaum zu erwarten. Eine ähnliche Kurve entsteht bei der grafischen Darstellung des Verhältnisses der stammspezifischen Gene zur Anzahl der Genome (Abbildung 4. 3 B), berechnet für EcN. Auch hier wird die Anzahl der stammspezifischen Gene unter Einbeziehung weiterer Genome nur noch geringfügig abnehmen.

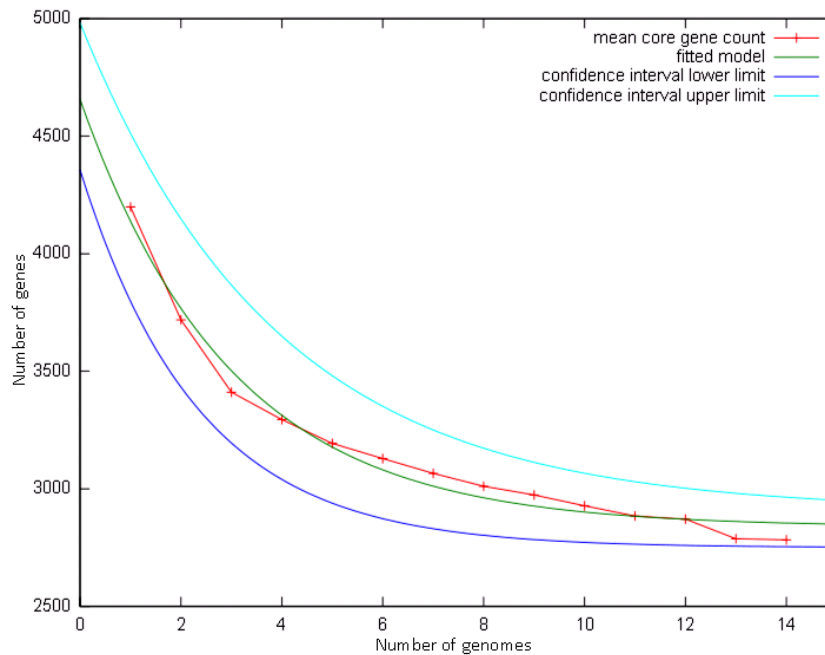
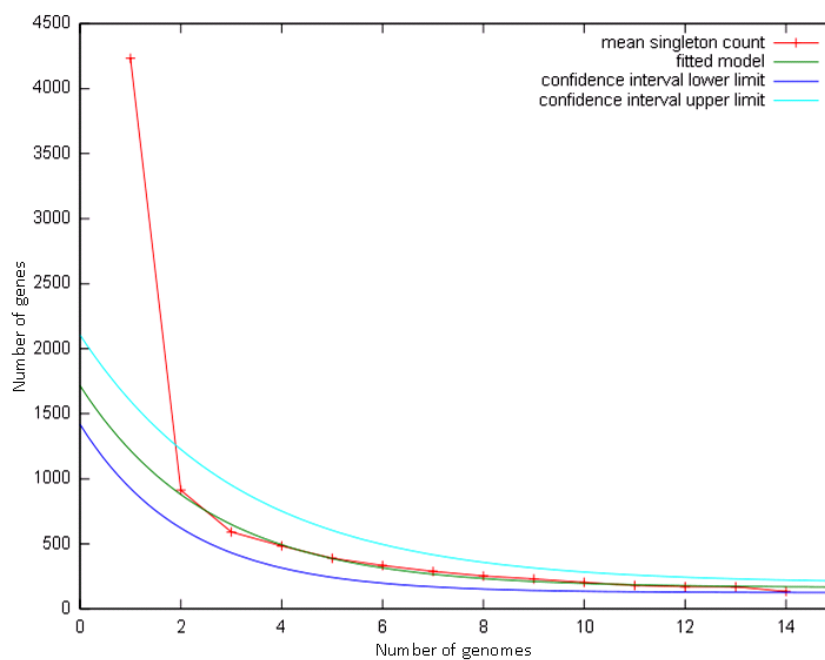
A**B**

Abbildung 4.3 Entwicklung der Kerngenomgröße und der Anzahl EcN-spezifischer Gene

A: Dargestellt ist die Abnahme der Größe des Kerngenoms bezogen auf die Anzahl der *E. coli*-Genome, die in die Berechnung eingehen. Die Grafik zeigt, dass unter Einbeziehung weiterer Genome die Anzahl der Gene des Kerngenoms für alle *E. coli* nur noch leicht abnehmen wird.

B: Die Anzahl der stammspezifischen Gene reduziert sich mit steigender Zahl der Genome. Mit jedem weiteren Genom, das in die Berechnung einbezogen wird, wird es eine nur noch geringfügige Veränderung in der Anzahl der stammspezifischen Gene geben.

4.1.4 Horizontaler Gentransfer und genomische Inseln in EcN

Genomische Inseln (GI) gehören zu den mobilen genetischen Elementen, die durch horizontalen Gentransfer erworben werden. Sie sind definiert als Genomregionen mit einer Größe von mindestens 10 kb, die von charakteristischen Sequenzwiederholungen (Direct Repeats, DRs) flankiert werden und häufig Gene kodieren, die Antibiotikaresistenzen erzeugen oder für Symbiose und bakterielle Fitness zuständig sind, wodurch die Anpassungsfähigkeit an ökologische Nischen und die Konkurrenzfähigkeit gegenüber anderen Stämmen verbessert wird. Des Weiteren sind funktionelle oder fragmentierte Insertionselemente (IS-Elemente) und Integrasen Bestandteil dieser Inseln. GI sind häufig in der Nachbarschaft von tRNAs zu finden, die aufgrund ihrer Sequenzen als bevorzugte Orte für die Integration von Fremd-DNA gelten. Der GC-Gehalt der GI weicht in der Regel vom GC-Gehalt des Kerngenoms ab (Dobrindt et al., 2004).

4.1.4.1 Identifizierung der genomischen Inseln in EcN

In bisherigen Genomanalysen von EcN sind vier genomische Inseln (GEI I-IV) identifiziert worden, von denen die Sequenzen der GEI I, GEI II und GEI III vollständig bekannt sind (Grozdanov et al., 2004). Die Sequenzanalyse des gesamten EcN-Genoms zeigt jedoch, dass es insgesamt 12 größere Bereiche im Genom gibt, die wahrscheinlich durch horizontalen Gentransfer erworben wurden. Die 9 genomischen Inseln und 3 große Prophagen sind in Tabelle 4. 2 aufgelistet. Die Bereiche der genomischen Inseln und Prophagen sind durch ihre zugehörigen Locus tags angegeben, auch wenn sich Beginn und Ende in intergenischen Regionen befinden.

Die Größe der GI und Prophagen in EcN variiert zwischen 12 kb und 109 kb. Die GI sind mit Ausnahme der GI_{EcN}IV tRNA-assoziiert und weisen die typischen Strukturen mit Integrasen, Kodierung von Fitnessfaktoren, Transposasen und IS-Elementen auf. Zum Teil sind flankierende DRs vorhanden, die mit Hilfe des Programms Repeat Around (Goios et al., 2006) identifiziert werden konnten. Der GC-Gehalt der einzelnen genomischen Inseln liegt meistens deutlich unter oder über dem GC-Gehalt von 50,58% des gesamten EcN-Genoms. Da die ursprünglich benannten GI nur zum Teil mit den Sequenzen der in dieser Arbeit identifizierten Bereiche übereinstimmen, werden die GI und Prophagen neu benannt: GI_{EcN}I-IX und Φ I-III.

Tabelle 4. 2 Genomische Inseln und Prophagen in EcN

Nr.	Name	Beschreibung	Größe [kb]	Beginn	Ende	GC- Gehalt [%]	tRNA (Locus tag)
1	GI _{EcN} I	GI	19	ECN0042	ECN0062	43,6	<i>selC</i> (ECN0063)
2	GI _{EcN} II	GI	106,9	ECN0850	ECN0965	47,7	<i>pheV</i> (ECN0966)
3	GI _{EcN} III	<i>gsp-2, kps, aer</i> GI	32,5	ECN1109	ECN1134	53,06	<i>metV</i> (ECN1135)
4	Φ _{EcN} I	Prophage	12	ECN1730	ECN1753	49,7	<i>proL</i> (ECN1754)
5	GI _{EcN} IV	GI	44,4	ECN1948	ECN1996	49,2	-
6	GI _{EcN} V	GI	54,2	ECN2002	ECN2027	53,2	<i>asnV</i> (ECN2028)
7	GI _{EcN} VI	<i>pks</i> GI	33,9	ECN2034	ECN2051	57,0	<i>asnT</i> (ECN2052)
8	Φ _{EcN} II	<i>ybt</i> Prophage	43,8	ECN2185	ECN2237	51,5	-
9	Φ _{EcN} III	Prophage	42,8	ECN2912	ECN2970	50,3	-
10	GI _{EcN} VII	<i>sit</i> GI	108,9	ECN3089	ECN3211	48,6	<i>serX</i> (ECN3088)
11	GI _{EcN} VIII	<i>iro, foc, mch, mcm</i> GI	93,5	ECN3959	ECN4069	47,1	<i>aspV</i> (ECN4070)
12	GI _{EcN} IX	<i>pic, fecCD-family</i> GI	82,5	ECN4415	ECN4500	48,9	<i>leuX</i> (ECN4501)
		<i>fec</i>					

GI genomische Insel; *gsp* general secretion pathway; *kps* Kapselbiosynthese; *aer* Aerobactin; *pks* Peptid-Polyketid-Hybrid; *ybt* Yersiniabactin; *sit* Mangan- und Eisentransportsystem; *iro* Salmochelin; *foc* F1C-Fimbrien; *mch* und *mcm* Mikrozine; *pic* Serinprotease Autotransporter; *fec* Eisendicitratsystem

GI_{EcN}I kodiert überwiegend hypothetische Proteine und wird beidseitig von zwei DRs flankiert. DR1 wurde für die genomische Insel AGI-3 des APEC-Stamms BEN2908 beschrieben (Chouikha et al., 2006) und flankiert ebenfalls PAI I₅₃₆ von *E. coli* 536 (Middendorf et al., 2004) und GI-CFT073-*selC* von *E. coli* CFT073 (Lloyd et al., 2007). DR2 (GAAGAGGCATTTTGGCG) ist jeweils stromaufwärts der beiden DR1 zu finden. Einzelne kurze Sequenzabschnitte weisen Homologien zu Genen anderer *E. coli* oder Salmonellen auf. Die Zusammensetzung dieser GI ist bisher einzigartig.

GI_{EcN}II entspricht größtenteils der als GEI II bekannten genomischen Insel (Grozdanov et al., 2004). Sie enthält ein fast vollständiges zweites TypII-Sekretionssystem (*gspC-2D-2E-2F-2G-2H-2I-2J-2K-2L-2M-2*, ECN0851-ECN0861), Gene der Kapselsynthese (*kps*, *kfi*, ECN0862-0874), den Autotransporter *sat* (ECN0936) und das Aerobactin-Eisenaufnahmesystem (ECN0940-0944). Flankierende DRs konnten nicht ermittelt

werden. Diese GI ist mit 106,9 kb deutlich größer als die in den Nukleotiddatenbanken eingetragene GEI II mit 96,5 kb (Datenbank-Nr. AJ586888) und die von Grozdanov et al. mit einer Länge von 103 kb publizierten Insel (Grozdanov et al., 2004).

Abbildung 4. 4 stellt einen Ausschnitt dieser Insel in EcN im Vergleich zu *E. coli* CFT073 dar. Im Gegensatz zu EcN sind dort durch Transposaseaktivität vermutlich die paralogen Gene des Sekretionssystems GSP deletiert worden.

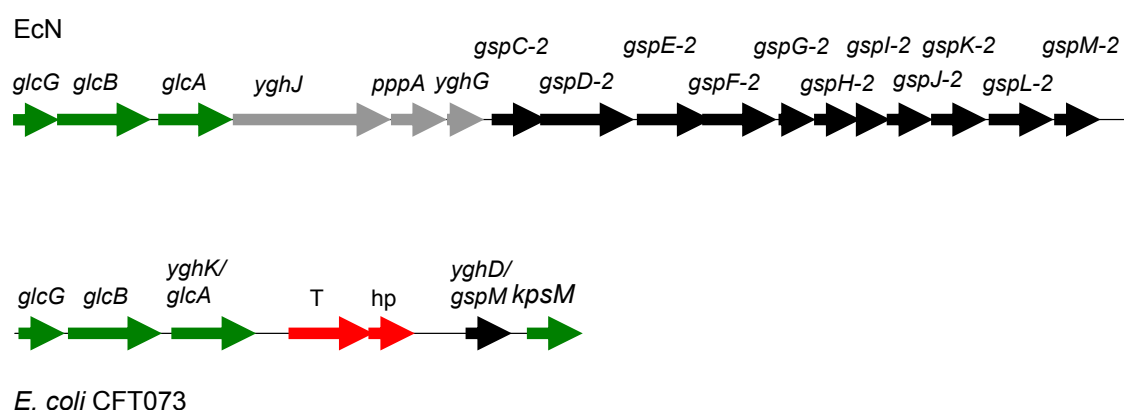


Abbildung 4. 4 Genvergleich von EcN und *E. coli* CFT073 im Bereich der GI_{EcNII}

Ein Vergleich der Gene von EcN (oben) und *E. coli* CFT073 (unten) lässt auf einen Genverlust des zweiten TypII-Sekretionsapparates GSP (general secretion pathway) in *E. coli* CFT073 durch Insertions- und Deletionseignisse schließen. Eine Transposase ersetzt hier einen Teil der GSP-Gene. EcN enthält dagegen an dieser Stelle ein nahezu vollständiges GSP. T Transposase; hp hypothetisches Protein; *glc* Glyoxylatkatabolismus; *gsp* general secretion pathway; *kps* Kapselbiosynthese

Die genomische Insel **GI_{ECNIII}** der Länge 32,5 kb hat einen GC-Gehalt von 53,06%. Dieser Bereich, der in der Nachbarschaft der Methionin-tRNA ECN1135 liegt, enthält einige noch nicht näher charakterisierte Gene sowie die Gene des sezernierten Proteins Hcp (ECN1129) und des Chaperons *clpB* (ECN1127), die möglicherweise zu einem TypVI-Sekretionssystem gehören (Bingle et al., 2008; Pukatzki et al., 2007), und ein maltose- und glucosespezifisches Phosphotransferasesystem. Es sind keine Transposasen und IS-Elemente annotiert. Diese Insel ist homolog zu PAI-CFT073-*metV*. Entsprechende Sequenzen sind ebenfalls in den UPEC-Stämmen 536 und UTI89 und in APEC O1 vorhanden.

GI_{ECNIV} mit einer Größe von 44,4 kb und einem GC-Gehalt von 49,2% umfasst die Gene ECN1948 bis ECN1996. Diese Insel ist größtenteils homolog zu der genomischen

Insel GI-CFT073-*cobU* und enthält ein Transportsystem der FecCD-Familie (ECN1964) sowie einige nicht näher charakterisierte Enzyme.

GI_{EcN}V enthält die Gruppe der Colibactin-Gene *clbA-Q*. Diese kodiert eine Maschinerie zur Herstellung der Peptid-Polyketid-Verbindung Colibactin. Die GI wird auch als *pks*-Insle bezeichnet. Colibactin-Gene sind in Kommensalen und ExPEC weit verbreitet (Nougayrede et al., 2006).

Die Insel **GI_{EcN}VI** trägt ein Gencluster zur Expression des Siderophorensystems Yersiniabactin, das ebenfalls zur Gruppe der Peptid-Polyketid-Hybride gehört. Die GI hat große Ähnlichkeit bezüglich Größe und Sequenz zu der Pathogenitätsinsel HPI aus *Yersinia pestis* und einigen UPEC-Stämmen (Schubert et al., 2004).

Mit über 108 kb ist **GI_{EcN}VII** die größte genomische Insel des EcN-Genoms. Sie wird von DRs flankiert (DR: CCCCTCACCGCCA) und enthält die bereits veröffentlichte GEI I, die mit 97,2 kb (Grozdanov et al., 2004) bzw. 97,6 kb (Datenbankeintrag: AJ586887) jedoch deutlich kleiner ausfällt. Neben einigen noch nicht näher charakterisierten hypothetischen Proteinen sind folgende Gene in dieser Sequenz enthalten: Autotransporter der *flu*-Familie (ECN3104), *iroBCDEN* des Siderophorensystems Salmochelin, die *foc*-Gene zur Expression der F1C-Fimbrien und die Gene *mcm* und *mch* der Mikrozyme M und H47. Zusätzlich ist eine von Transposasen flankierte Arginin-tRNA (ECN3118) vorhanden.

GI_{EcN}VIII ist der 100 kb großen Insel PAI-CFT073-*aspV* des UPEC CFT073 ähnlich (Lloyd et al., 2007) und enthält unter anderem die Serinprotease *pic* (ECN3974), ein mögliches Phosphotransferasesystem (ECN3989-ECN3991) und ein Eisenaufnahmesystem der FecCD-Familie (ECN4031-ECN4034).

Die genomische Insel **GI_{EcN}IX**, die das Eisendicitrat-Aufnahmesystem (*fecIRABCDE*) kodiert, weist Homologien zu der Pathogenitätsinsel SRL-PAI von *Shigella flexneri* 2a (Luck et al., 2001) und zu ETEC E24377A auf. Dieses Siderophorensystem ist in Kommensalen und Shigellen, jedoch nicht in den anderen ExPEC-Stämmen vorhanden. Neben den GI konnten die drei Prophagen $\Phi_{EcN}I$, $\Phi_{EcN}II$ und $\Phi_{EcN}III$ identifiziert werden. $\Phi_{EcN}I$ ist in der Nachbarschaft der Prolin-tRNA (ECN1754) lokalisiert. Der Prophage $\Phi_{EcN}III$ enthält die Virulenz-assoziierten Gene *sitABCDE* eines Eisen- und Manganaufnahmesystem und ist annähernd gleich groß wie $\Phi_{EcN}II$.

4.1.4.2 GEI III und die genetisch variable Region *dsdCXA-argW*

Die 37,9 kb große Insel GEI III (Datenbankeintrag: AJ586889) nach Grozdanov et al. (Grozdanov et al., 2004) konnte mit dieser Sequenz im EcN-Genom nicht gefunden werden. Ein 23,7 kb langes Fragment ist zwar homolog zu der 23,7 kb langen Sequenz in der Nachbarschaft der tRNA *argW* (ECN1570), die als Ort der Insertion angegeben ist, sie weist jedoch keine Charakteristika einer GI auf. Ein 7,8 kb großes Fragment von GEI III ist Teil der GI_{EcNII}, ein 4,7 kb-Fragment liegt im Kerngenom von EcN. Die benannten Fragmente und übrige kurze Sequenzen sind über das ganze Genom verteilt. Wie die nähere Betrachtung der Region um die tRNA *argW* verschiedener *E. coli* zeigt (Abbildung 4. 5), handelt es sich hier um einen sehr variablen Bereich zwischen der tRNA *argW* und den Genen des D-Serin-Metabolismus *dsdCXA*. Die flankierenden Sequenzen gehören dem Kerngenom an und sind in allen *E. coli* homolog. Das Operon *dsdCXA* ermöglicht die Nutzung von D-Serin als Kohlenstoff-Quelle, wie für *E. coli* MG1655 und *E. coli* CFT073 gezeigt wurde (Moritz und Welch, 2006). D-Serin ist Bestandteil des Urins und wirkt in hohen Konzentrationen bakteriostatisch (Cosloy und McFall, 1973). Es wird angenommen, dass die Fähigkeit zum Serin-Metabolismus im Urin die Virulenz von UPEC-Stämmen fördert (Roesch et al., 2003). Das entsprechende Operon ist in Kommensalen und ExPEC zu finden.

EcN und *E. coli* CFT073 besitzen beide ein *dsdCXA*-Operon und kodieren außerdem zwei Rekombinasen und einen Autotransporter, die große Homologien zueinander aufweisen, während bei *E. coli* MG1655 und *E. coli* EDL933 Prophagen inseriert sind. Das *dsdCXA*-Operon ist in *E. coli* EDL933 durch die Insertion eines Prophagen zerstört. Stattdessen befindet sich hier ein Operon für den Sucrosemetabolismus. *E. coli* HS weist an dieser Stelle keine Insertion von Fremd-DNA auf (Abbildung 4. 5). Große Ähnlichkeit mit EcN und *E. coli* CFT073 zeigt auch *E. coli* SMS-3-5 in dieser Region. Insertionen durch Prophagen werden ebenfalls in den *E. coli*-Stämmen DH10B, W3110, UTI89 und APEC O1 gefunden. *E. coli* 536 besitzt anstelle des *dsdCXA*-Clusters wie die *E. coli*-Stämme EDL933, O157:H7 Sakai und E24377A ein Phosphotransferase-unabhängiges Zuckertransportsystem (Brzuszkiewicz et al., 2006; Moritz und Welch, 2006).

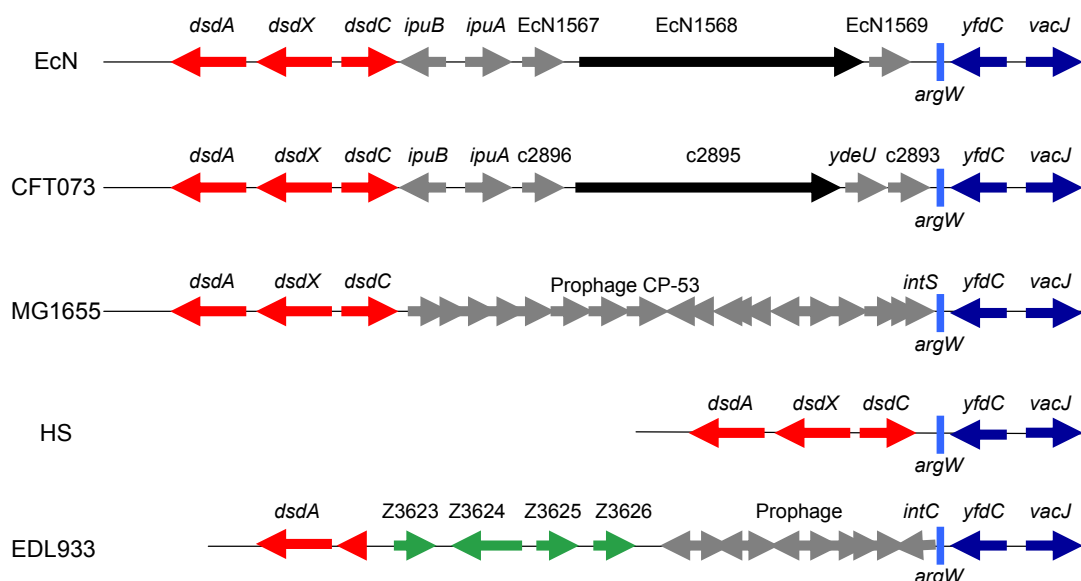


Abbildung 4. 5 Die genetisch variable Region *dsdCX-argW* in *E. coli*

Dargestellt ist die hoch variable Region um die tRNA *argW* ausgewählter *E. coli*. Rot: Gene für den D-Serin-Metabolismus; blau: Gene des Kerngenoms; grün: Gene für den Sucrosemetabolismus; schwarz: Autotransporter-Gene; grau: übrige Gene. Modifiziert nach (Moritz und Welch, 2006)

Obleich in anderen *E. coli*-Genomen in der Nachbarschaft der tRNA *argW* Integrasen und Prophagen lokalisiert sind und die Insertion in EcN mit etwa 12 kb die Größe einer GI besitzt, können in EcN innerhalb dieser fünf Gene (*ECN1565-1569*) keine typischen Elemente einer GI oder eines Prophagen detektiert werden, so dass dieser Bereich nicht als genomische Insel ausgewiesen wird. Ein annähernd gleiches Bild ergibt der Sequenzvergleich mit *E. coli* CFT073. Auch in diesem Genom wurde für diesen Sequenzbereich keine Insel beschrieben (Lloyd et al., 2007).

4.1.5 Homologie von EcN und *E. coli* CFT073

Die nahe Verwandtschaft von EcN zu dem uropathogenen Stamm *E. coli* CFT073, die bereits experimentell herausgestellt wurde (Grozdanov et al., 2004), wird durch einen Vergleich sowohl auf Protein- als auch auf Nukleotidebene bestätigt. Der in Abbildung 4. 6 dargestellte phylogenetische Baum der 14 *E. coli*-Genome (Tabelle 4. 1) zeigt, dass die Homologie dieser beiden Stämme deutlich größer ist als die Homologie von EcN zu den anderen uropathogenen Stämmen *E. coli* 536 und *E. coli* UTI89.

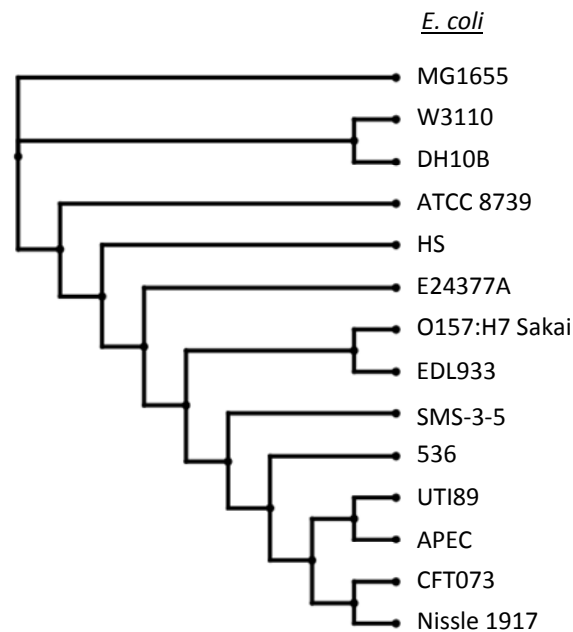


Abbildung 4. 6 Phylogenie von 14 *E. coli*-Genomen

Der phylogenetische Baum zeigt die Verwandtschaft der 14 *E. coli*-Stämme auf der Grundlage ihrer Kerngenome.

Signifikante Unterschiede zwischen EcN und *E. coli* CFT073 sind vor allem durch die genomischen Inseln und Prophagen und die darin enthaltenen Virulenzdeterminanten bedingt, was sich anhand der zirkuläre Darstellung des EcN-Genoms (Abbildung 4. 1) vermuten lässt. Neben den über weite Strecken homologen Sequenzen gibt es einige Regionen, die keine oder kaum Übereinstimmung zeigen. Zur detaillierten Analyse wird ein Homologievergleich der Genome von EcN und *E. coli* CFT073 durchgeführt (3.10.3) und grafisch dargestellt (Abbildung 4. 7). Die GI und Prophagen von EcN (4.1.4) und *E. coli* CFT073 (Lloyd et al., 2007) sind eingezeichnet. Die zugehörigen tRNAs markieren Anfang oder Ende einer Insel. Die Genomstruktur und die Unterschiede der beiden Stämme werden im Folgenden näher untersucht.

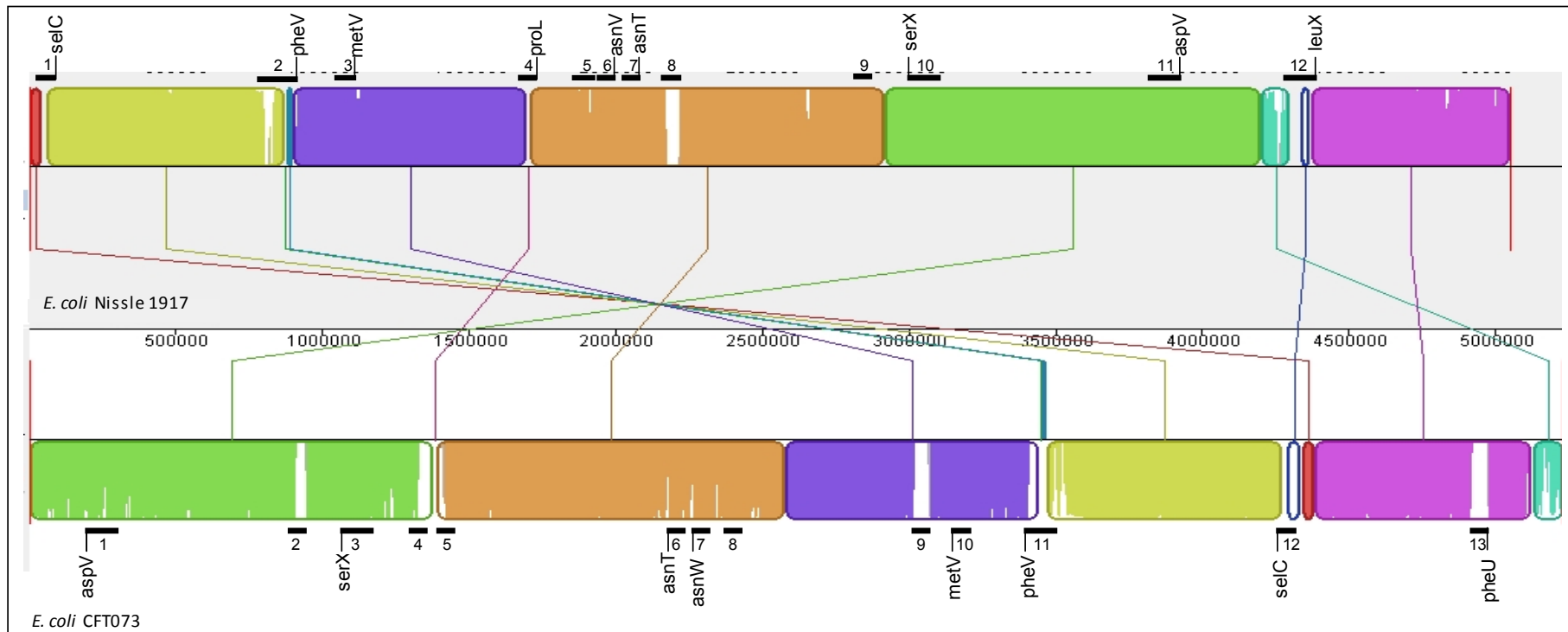


Abbildung 4. 7 Homologievergleich der Genome von EcN und *E. coli* CFT073

Ein Vergleich des EcN-Genoms mit dem Genom des uropathogenen Stamms *E. coli* CFT073 auf Nukleotidebene mit dem Programm Mauve 2.2.0 (Darling et al., 2004) bestätigt die nahe Verwandtschaft beider Stämme. Die Darstellung der Genome ist gegenläufig. Die schwarzen Balken zeigen die Lage der genomischen Inseln und Prophagen mit den zugehörigen tRNAs an.

E. coli Nissle 1917: 1-3=GI_{EcN}I-III, 4=ΦI, 5-7= GI_{EcN}IV-VI, 8-9= ΦII und ΦIII, 10-12= GI_{EcN}VII-IX;

E. coli CFT073: 1-13 nach (Lloyd et al., 2007): 1=PAI-CFT073-*aspV*, 2=Φ-CFT073-*b0847*, 3=PAI-CFT073-*serX*, 4=Φ-CFT073-*potB*, 5=PAI-CFT073-*icdA*, 6=PAI-CFT073-*asnT*, 7=GI-CFT073-*asnW*, 8=GI-CFT073-*cobU*, 9=Φ-CFT073-*smpB*, 10=PAI-CFT073-*metV*, 11=PAI-CFT073-*pheV*, 12=GI-CFT073-*selC*, 13=PAI-CFT073-*pheU*

4.1.5.1 Vergleich der Genomstrukturen von EcN und *E. coli* CFT073

Das EcN-Genom enthält 12 durch horizontalen Gentransfer erworbene Regionen, darunter 3 Prophagen (4.1.4). *E. coli* CFT073 enthält 13 derartige Regionen, sie umfassen 3 GI, 6 PAI und 4 Prophagen (Lloyd et al., 2007). Die Differenzen in der Genomlänge von 5,05 Mb (EcN) und 5,23 Mb (*E. coli* CFT073, vgl. Tabelle 4. 1) sind, wie in 4.1.3 beschrieben, überwiegend auf horizontalen Gentransfer zurückzuführen. Der Homologievergleich (Abbildung 4. 7) zeigt, dass die Regionen in beiden Stämmen überwiegend ähnlich oder sogar identisch sind. Dadurch entsteht eine in beiden Stämmen ähnliche Mosaikstruktur des Genoms.

Die Unterschiede der LCBs beider Stämme werden auf den ersten Blick durch die GI/PAI und Prophagen abgedeckt. Der Genomvergleich mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (Altschul et al., 1997) ermöglicht die Identifizierung der Unterschiede auf Nukleotidebene, dessen Ergebnisse in Tabelle 4. 3 in Kurzform dargestellt sind. Beide Stämme weisen eine große Ähnlichkeit des flexiblen Genpools bezüglich der GI/ PAI und Prophagen auf.

Tabelle 4. 3 GI und Prophagen (Φ) von EcN und ihr Vorkommen in *E. coli* CFT073

GI und Φ in EcN	Größe [kb]	GI/ PAI und Φ in <i>E. coli</i> CFT073	Größe [kb]	Homologie
GI _{EcN} I	19	–	68	–
GI _{EcN} II	106,9	PAI-CFT073- <i>pheV</i>	123	82,5 kb als Fragmente homolog; <i>hly</i> , <i>pap</i> in <i>E.coli</i> CFT073
GI _{EcN} III	32,5	PAI-CFT073- <i>metV</i>	32	
Φ _{EcN} I	12	Φ -CFT073- <i>potB</i>	44	
GI _{EcN} IV	44,4	GI-CFT073- <i>cobU</i>	44	41 kb homolog
GI _{EcN} V	54,2	GI-CFT073- <i>asnW</i>	54	homolog
GI _{EcN} VI	33,9	PAI-CFT073- <i>asnT</i>	32	homolog bis auf 700bp Insertion
Φ _{EcN} II	43,8	–	–	–
Φ _{EcN} III	42,8	PAI-CFT073- <i>icdA</i>	54	42,8 kb homolog
GI _{EcN} VII	108,9	PAI-CFT073- <i>serX</i>	113	104 kb homolog
GI _{EcN} VIII	93,5	PAI-CFT073- <i>aspV</i>	100	93 kb homolog
GI _{EcN} IX	82,5	–	–	–

Wie aus Tabelle 4. 3 ersichtlich ist, gibt es drei Regionen im EcN-Genom ($GI_{EcN}I$, $\Phi_{EcN}II$, $GI_{EcN}IX$), für die keine entsprechenden Regionen in *E. coli* CFT073 existieren, während die übrigen Regionen überwiegend homolog sind. Der Prophage ΦI in EcN enthält allerdings nur ein 6 kb-Fragment, das homolog zu dem insgesamt deutlich größeren Prophagen Φ -CFT073-*potB* von *E. coli* CFT073 ist.

Ausgehend von *E. coli* CFT073 gibt es ebenfalls drei Regionen, die in EcN nicht vorhanden sind: Φ -CFT073-b0847, Φ -CFT073-*smpB* und PAI-CFT073-*pheU*. Letztere kodiert ein *pap*-Operon zur Expression der P-Fimbrien. Weitere Pathogenitätsfaktoren in Form von Hämolyisin (*hly*) und P-Fimbrien (*pap*) sind auf der Insel PAI-CFT073-*pheV* lokalisiert. Auf der korrespondierenden $GI_{EcN}II$ fehlen diese Gene (Grozdanov et al., 2004). Diese Inseln erklären die wesentlichen Unterschiede im Phänotyp der beiden Stämme *E. coli* CFT073 und EcN bezüglich ihrer Pathogenität.

Des Weiteren unterschieden sich $GI_{EcN}II$ und PAI-CFT073-*pheV* dadurch, dass einige kurze Regionen innerhalb dieser Inseln invers und in anderer Reihenfolge vorhanden sind (Rearrangements), so dass die Sequenz im Homologievergleich in mehrere Fragmente unterschiedlicher Größe unterteilt wird. Insgesamt sind dennoch etwa 82,5 kb in beiden Inseln identisch. Es fehlen einige Gene für den TypII-Transportapparat GSP in *E. coli* CFT073, wie bereits in Abschnitt 4.1.4 und Abbildung 4. 4 dargestellt. Die Kapselbiosynthesegene *kfiABCD*, die in dieser GI bzw. PAI lokalisiert sind, sind sowohl für EcN als auch für *E. coli* CFT073 teilweise stammspezifisch, d.h. weniger als 50% über 50% ihrer Länge homolog.

4.1.5.2 Virulenz- und Fitnessfaktoren

Für die UPEC-Stämme werden verschiedene Virulenzfaktoren wie Adhäsine, Toxine und Siderophoren beschrieben (1.3), die in Tabelle 4. 4 aufgelistet sind. Der Vergleich von EcN und *E. coli* CFT073 zeigt, dass EcN mit Ausnahme der bereits erwähnten Virulenzgencluster *hly* und *pap* mit wenigen Abweichungen alle in *E. coli* CFT073 beschriebenen Virulenzfaktoren enthält.

Tabelle 4. 4 Vorkommen der Virulenzfaktoren von *E. coli* CFT073 in EcN

Gen	Beschreibung	Locus tag <i>E. coli</i> CFT073	Locus tag EcN	Bemerkung
<i>fimH</i>	Typ 1 Fimbrien-Adhäsın	c5400	ECN4405	98% identisch
<i>focG</i>	F1C-Fimbrien Protein G	c1244	ECN3133	identisch
<i>sfaA</i>	S-Fimbrien-Untereinheit	-	-	-
<i>papG</i>	P-Fimbrien-Adhäsın	c3583, c5179	-	-
<i>kpsMT</i>	Kapsel, Transportsystem	c3698, c3697	ECN0862, ECN0863	96% bzw. 88% identisch
<i>hlyA</i>	Hämolysin (Toxin)	c3570	-	-
<i>cnf</i>	Zytotoxisch nekrotisierender Faktor	-	-	-
<i>cdt</i>	Zytoleales Toxin	-	-	-
<i>irp2, fyuA</i>	Yersiniabactin Bio- syntheseprotein und Rezeptor	c2419, c2436	ECN2039- ECN2050	identisch bis auf IS in CFT073
<i>iucABCD, iutA</i>	Aerobactin	c3623-c3627	ECN0940- ECN0944	90-99% identisch, Längenunterschiede
<i>iroN</i>	Salmocheilin (Rezeptor)	c1250	ECN3127	Identisch
<i>sitABCD</i>	Eisen- und Mangantransport	c1597-c1600	ECN2914- ECN2917	99% identisch
<i>chuSA</i>	Häm Transportprotein und Rezeptor	c4307, c4308	ECN0246- ECN0247	100% bzw. 99% identisch*
<i>sat</i>	Autotransporter	c3619	ECN0936	99% identisch; 9 unterschiedliche AS
<i>pic</i>	Autotransporter Serinprotease	c0350	ECN3974	99% identisch*
<i>tsh/vat/sepA</i>	Vakuolisierender Autotransporter	c0393	ECN3932	identisch
<i>flu</i>	Autotransporter	-	ECN4462	-
<i>upaF/ag43a</i>	Autotransporter	c3655	ECN0891, ECN0892	Pseudogene
<i>upaD/ag43b</i>	Autotransporter	c1273	ECN3104	in EcN verkürzt
<i>upaG</i>	Autotransporter	c4424	ECN0130	identisch
<i>yfaL</i>	Autotransporter	c2775	ECN1686	identisch
<i>upaB</i>	Autotransporter	c0426	ECN3897	identisch
<i>upaC</i>	Autotransporter	c0478	ECN3847	99% identisch
<i>upaE</i>	Autotransporter	c2895	ECN1568	Längenunterschiede
<i>eaeH</i>	“Attaching and effacing protein”, Autotransporter	c0415	ECN3909	identisch
<i>iha</i>	Adhäsın und Siderophorenrezeptor	c3610	ECN0919	99% identisch
<i>usp</i>	Uropathogen-spezifisches Protein	c0133	ECN4189	identisch
<i>uspA</i>	Universeller Regulator der globalen Stressantwort	c4293	ECN0261	identisch
<i>yad/htr/ecp</i>	Putatives Fimbrien-Operon	c0166-c0172	ECN4151- ECN4157	identisch
<i>aufA-G</i>	Auf-Fimbrien	c4207-c4214	ECN0344- ECN0338	größtenteils identisch

* Startcodon in EcN ist L statt M

AS Aminosäuren; IS Insertionselement

Pili und Fimbrien gehören zu den Virulenz-assoziierten Adhäsinen. Diese dünnen Oberflächenorganellen Gram-negativer Bakterien dienen der Anheftung an andere Bakterien oder an Epithelzellen. EcN exprimiert Typ1-Fimbrien (*fim*, ECN4405-ECN4414), F1C-Fimbrien (*foc*, ECN3130-3138), Curli-Fimbrien (*csg*, ECN3075-ECN3083) (Blum et al., 1995a; Schulze et al., 2006) und kodiert F9-Fimbrien (EcN 2584-2589). Die F9-Fimbrien sind zu 50-60% homolog zu Typ1- und F1C-Fimbrien und kommen in UPEC-Stämmen (Ulett et al., 2007a), EHEC EDL933 und mit natürlicher Deletion in *E. coli* K-12 (Low et al., 2006) vor. Die Typ 1-, F1C-, Curli- und F9-Fimbrien sind auch im Genom von *E. coli* CFT073 kodiert.

Das in *E. coli*-Stämmen weit verbreitete *fim*-Operon der TypI-Fimbrien enthält die Rekombinasen FimE und FimB, die die Expression der Fimbrien in einem „Phase Switch“ System durch die Inversion eines 314bp langen DNA-Fragments kontrollieren (Pallesen et al., 1989; McClain et al., 1993). In *E. coli* CFT073 gibt es fünf Paraloge dieser *fimBE*-artigen Gene, von denen zwei Kopien mit dem TypI-Fimbrienlocus assoziiert sind (Welch et al., 2002). In EcN finden sich ebenfalls fünf Paraloge: *ipbA* (ECN3893), *ipuB* (ECN1565), *ipuA* (ECN1566), *fimB* (ECN4414) und *fimE* (ECN4413). Das Gen *fimB* (ECN4414) ist infolge der Insertion einer Transposase verkürzt, was zu einer Expression der TypI-Fimbrien nur unter statischen Kulturbedingungen führt (Stentebjerg-Olesen et al., 1999).

Autotransporter, eine Untergruppe der Adhäsine, gelten ebenfalls als Virulenzfaktoren pathogener Mikroorganismen. Sie werden über ein TypV-Sekretionssystem durch die innere und äußere Zellmembran Gram-negativer Bakterien transportiert, wo sie entweder auf der Bakterienoberfläche verbleiben oder an die Umgebung abgegeben werden (Henderson et al., 2004). Alle 10 für *E. coli* CFT073 bisher beschriebenen Autotransporter, Sat, Pic, YfaL, Vat, UpaB, UpaC, UpaD, UpaE, UpaF und UpaG (Parham et al., 2004), sind ebenfalls in EcN vorhanden (ECN0936, ECN3974, ECN1686, ECN3932, ECN3897, ECN3847, ECN3104, ECN1568, ECN0891 und ECN0892, ECN0130). Drei Autotransporter weisen Unterschiede auf, die im Folgenden beschrieben werden:

- Der Sat-Autotransporter in EcN (ECN0936) enthält einige Punktmutationen, von denen 9 zu einer Veränderung in der Aminosäuresequenz führen. Über die Funktionalität des Autotransporters in EcN ist bisher nichts bekannt (Grozdanov et al., 2004).
- Der Autotransporter ECN1568 ist homolog zu dem aus 2384 Aminosäuren bestehenden UpaE in *E. coli* CFT073, die Aminosäuresequenz ist mit 2549 Aminosäuren um 165 Aminosäuren länger. Es handelt sich dabei um die in Abbildung 4. 5 dargestellten Autotransporter. Ein orthologes Gen mit einer Länge von 2637 Aminosäuren findet sich ebenfalls in *E. coli* SMS-3-5.
- Der Autotransporter UpaF, der auch als Ag43a bezeichnet wird, ist in der EcN-Sequenz durch eine Leserasterverschiebung in Form von zwei Pseudogenen (ECN0891 und ECN0892) annotiert und damit nicht funktionell. Ag43a (UpaF) ist in die Aggregation und Biofilmbildung involviert und fördert bei uropathogenen Stämmen die Persistenz im Urogenitaltrakt (Ulett et al., 2007b).

Zusätzlich zu den aufgelisteten Autotransportern enthält das EcN-Genom das Autotransporter-Gen *flu* (ECN4462), das ein phasenvariables, Membran-assoziiertes „fluffing“-Protein kodiert und in GI_{ECN}IX lokalisiert ist. Es ist weit verbreitet in den Arten *E. coli* und *S. flexneri*, es gibt jedoch kein orthologes Gen in *E. coli* CFT073, der keine derartige genomische Insel besitzt (Tabelle 4. 3).

Die Flagellen von *E. coli* sind peritrich angeordnet und sorgen für Mobilität der Bakterien. Die lösliche Komponente Flagellin von EcN ist zudem verantwortlich für die Induktion der hBD-2-Expression eukaryotischer Zellen (Schlee et al., 2007). Der Export-Apparat besteht aus *fliOPQR* und *flhAB*. Diese Komponenten bilden integrale Membranhelices, die durch kurze Schlaufen (Loops) miteinander verbunden sind (Minamino und Namba, 2004; Ohnishi et al., 1997). Der Vergleich des Exportapparats der H1-Flagellen von EcN mit *E. coli* CFT073 und weiteren *E. coli*-Stämmen zeigt, dass diese Gene hoch konserviert sind. In der EcN-Sequenz führt jedoch eine 3,1 kb-Deletion zu einer Verlängerung des *fliR* von 261 Aminosäuren auf 338 Aminosäuren und gleichzeitig zur Verkürzung des Gens *yedQ*, das ein hypothetisches Protein kodiert. Ein Ausschnitt dieses Genombereichs ist in

Abbildung 4. 8 dargestellt. Wie dort zu sehen ist, fehlen in EcN das Gen *rcaA*, das einen DNA-bindenden Transkriptionsaktivator kodiert, und die Gene *dsrB*, *yodD* und *yodP*, deren Funktionen nicht bekannt sind. Die Biosynthese der Flagellen von EcN scheint jedoch nicht beeinträchtigt zu sein, da sie mittels Serotypisierung als Serotyp H1 nachgewiesen werden können. Experimentelle Daten bezüglich des Gens *fliR* von EcN stehen bisher nicht zur Verfügung.

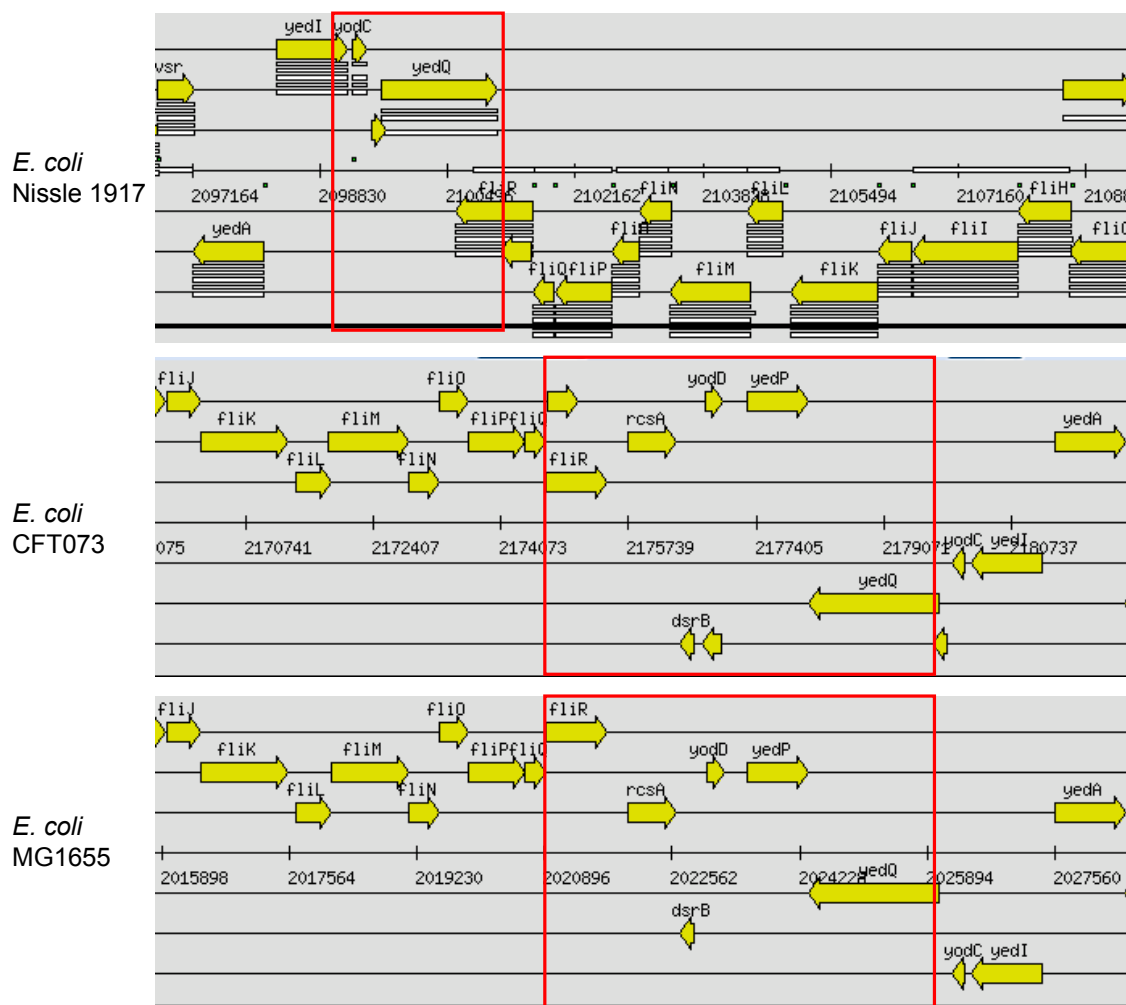


Abbildung 4. 8 Deletion im Bereich der Gene *yedQ* und *fliR* in EcN

Dargestellt sind Genom-Ausschnitte der *E. coli*-Stämme Nissle 1917, CFT073 und MG1655 aus GenDB 2.4. Der Bereich der Gene *fliR* und *yedQ*, der in *E. coli* Nissle 1917 eine Deletion aufweist, ist jeweils markiert.

Für EcN sind 6 verschiedene Siderophoren zur Eisenaufnahme beschrieben worden (Grozdanov et al., 2004). Neben Enterobactin, Salmochelin, Yersiniabactin, Aerobactin, Eisendicitrat-System und dem Häm-System gibt es weitere Eisenaufnahmesysteme wie das Oxidase-abhängige System EfeU (ECN3221), das ebenfalls in *E. coli* CFT073 und UTI89 vorhanden ist (Grosse et al., 2006), das Virulenz-assoziierte *sitABCD*-Operon (ECN2914-ECN2917) für die Aufnahme von Eisen und Mangan (Rodriguez-Siek et al., 2005; Snyder et al., 2004), den weit verbreiteten Feo-Eisentransporter (ECN0364-0366) (Cartron et al., 2006) und das Eisenhydroxamat-System Fhu (ECN4135-4138) (Rohrbach et al., 1995). Mindestens zwei weitere mögliche Transporter der FecCD-Familie sind in GI_{EcN}VIII (ECN4031-4034) und in GI_{EcN}IV (ECN1962-1965) lokalisiert. Sie stellen interessante Zielgene für weitere Analysen dar.

In Tabelle 4. 5 sind die bekannten Siderophorensysteme und weitere Transporter zur Eisenaufnahme und deren Vorkommen in den uropathogenen *E. coli*-Stämmen CFT073, 536 und UTI89 sowie in dem vogelpathogenen *E. coli* APEC O1 und in EcN aufgelistet. Bezüglich der Eisenaufnahmesysteme unterscheiden sich EcN und *E. coli* CFT073 darin, dass der uropathogene Stamm kein Eisendicitrat-Aufnahmesystem besitzt (4.1.5.1) und das Yersiniabactin-System durch eine etwa 700 bp große Insertion zerstört ist (Bultreys et al., 2006). Die Nachsequenzierung dieses Bereichs von *E. coli* CFT073 mit den Primern CFT073 ybt1-6 (8.2) bestätigt dies und zeigt gleichzeitig, dass die veröffentlichte Nukleotidsequenz (Welch et al., 2002) teilweise fehlerhaft ist. Mit Ausnahme des IS-Elements sind die Sequenzen in EcN und *E. coli* CFT073 völlig identisch. Zusätzlich exprimiert EcN das Eisendicitrat-Siderophorensystem, das in keinem der UPEC-Stämme oder *E. coli* APEC O1 kodiert wird, jedoch in allen kommensalen *E. coli* und den Laborstämmen (*E. coli* MG1655, DH10B und W3110) sowie in Shigellen nachzuweisen ist. Damit kodiert EcN mehr Eisenaufnahmesysteme als die übrigen *E. coli*.

Tabelle 4. 5 Eisenaufnahmesysteme in verschiedenen *E. coli*-Stämmen

Eisenaufnahme-system	EcN	<i>E. coli</i> CFT073	<i>E. coli</i> 536	<i>E. coli</i> UTI89	<i>E. coli</i> APEC O1
Enterobactin	+	+	+	+	+
Salmochelin	+	+	+	+	(-)
Yersiniabactin	+	(+)	+	+	+
Aerobactin	+	+	-	-	(-)
Eisendicitrat	+	-	-	-	-
Häm	+	+	+	+	+
<i>sitABCD</i>	+	+	+	+	+
<i>efeU</i>	+	+	+	+	+
<i>feo</i>	+	+	+	+	+
<i>fhu</i>	+	+	+	+	+

+ Eisenaufnahmesystem ist vorhanden

- Eisenaufnahmesystem ist nicht vorhanden

(+) Eisenaufnahmesystem enthält Leserasterverschiebung in mindestens einem Gen

(-) Eisenaufnahmesystem ist plasmidkodiert

4.1.6 Genotyp des alternativen Sigma-Faktors RpoS von EcN

Der alternative Sigma-Faktor RpoS ist eine Untereinheit der RNA-Polymerase und ersetzt bei *E. coli* unter bestimmten Bedingungen, z.B. bei Nährstoffmangel in der stationären Wachstumsphase oder bei Säurestress, in der generellen Stressantwort den vegetativen Sigma-Faktor RpoD. Der Genomvergleich und die Nachsequenzierung der *rpoS*-Gene von EcN (ECN1216) und *E. coli* CFT073 mit den Primern rpos 8 und rpos 22 zeigt eine nahezu identische Sequenz des Gens und auch der im Gen *nlpD* gelegenen Promotorregion. Der uropathogene Stamm weist jedoch an Position 397 der kodierenden Sequenz eine 5 nt lange Wiederholung (TAGAG) auf, die zu einer Leserasterverschiebung und dadurch direkt in dieser Sequenz zu einem vorzeitigen Stopcodon führt (Abbildung 4. 9). Die Funktionalität des RpoS von EcN und die Auswirkungen des verkürzten Sigma-Faktors RpoS von *E. coli* CFT073 werden im Säureresistenztest (3.5, 4.1.7) überprüft.

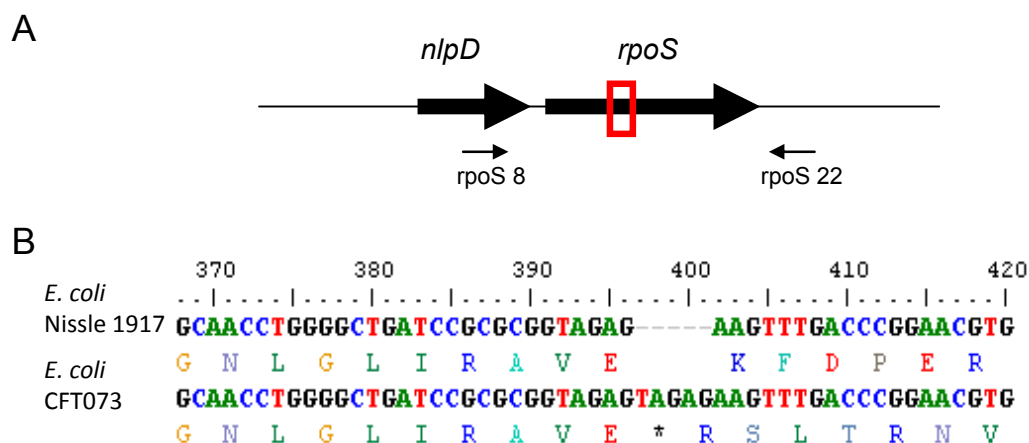


Abbildung 4.9 *rpoS*-Sequenzen von EcN und *E. coli* CFT073

A: Ausschnitt aus der genomischen DNA von EcN mit *nlpD* (ECN1215), das ein Lipoprotein kodiert, und *rpoS* (ECN1216), dem Gen des alternativen Sigma-Faktors RpoS der RNA-Polymerase. Die Positionen der für die Sequenzierung verwendeten Primer rpoS 8 und rpoS 22 sind durch Pfeile markiert. Ein Ausschnitt der *rpoS*-Sequenz ist in B vergrößert dargestellt. **B:** Ausschnitt der sequenzierten *rpoS*-Gene (368-420 nt) von EcN und *E. coli* CFT073 und die zugehörige Aminosäuresequenz des Leserasters. Das *rpoS*-Gen von *E. coli* CFT073 zeigt im Vergleich zum *rpoS* von EcN eine 5 nt lange Sequenzwiederholung, die zu einem vorzeitigen Stopcodon führt.

4.1.7 Funktionalität von RpoS und der Einfluss auf die Säureresistenz

Der Säureresistenztest (3.5) soll Aufschluss über die Funktionalität des RpoS von EcN und *E. coli* CFT073 geben. Dazu werden Bakterien in der späten exponentiellen Wachstumsphase einer pH-Verschiebung von pH 7 zu pH 2,5 ausgesetzt und die Überlebensrate der Bakterien bestimmt. Der säureresistente EHEC 126814 und die dazugehörige säureempfindliche *rpoS*-Deletionsmutante *E. coli* MHH126-5 werden als Kontrollstämme eingesetzt. Die Plasmide pDS3, pDS4 und pDS7 enthalten die *rpoS*-Gene mit der zugehörigen Promotorregion von *E. coli* CFT073 und EcN und dienen sowohl der funktionellen Charakterisierung als auch der Komplementation von Mutanten. Zu Herstellung der Plasmide wird das jeweilige *rpoS* mit den Primern rpoS 8 und rpoS 22 amplifiziert und über einen Restriktionsverdau mit *Hind*III in die Vektoren pBR322 bzw. pUC19 kloniert. Des Weiteren werden mit der Suizidvektormethode (3.4.2) die Genaustauschmutanten EcN-rpoS^{CFT} und *E. coli* CFT-rpoS^{EcN} generiert. Dabei wird das *rpoS* von EcN anstelle des entsprechenden Gens in *E. coli* CFT073 genomisch integriert (*E. coli* CFT-rpoS^{EcN}) und das *rpoS* von *E. coli* CFT073 entsprechend in EcN (EcN-rpoS^{CFT}) integriert. Für die Herstellung der dafür

verwendeten Suizidvektoren pDS10 (*rpoS* von EcN) und pDS11 (*rpoS* von *E. coli* CFT073) werden die *RpoS*-Gene von EcN und *E. coli* CFT073 mit den Primern *rpoS*1 und *rpoS*23 amplifiziert und nach Restriktionsverdau über die Schnittstellen *Sac*I und *Xba*I in den Suizidvektor pMHH1 kloniert. Die Mutanten werden im Vergleich zu den Wildtypstämmen auf Säureresistenz getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4. 10 dargestellt. Die Daten stammen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

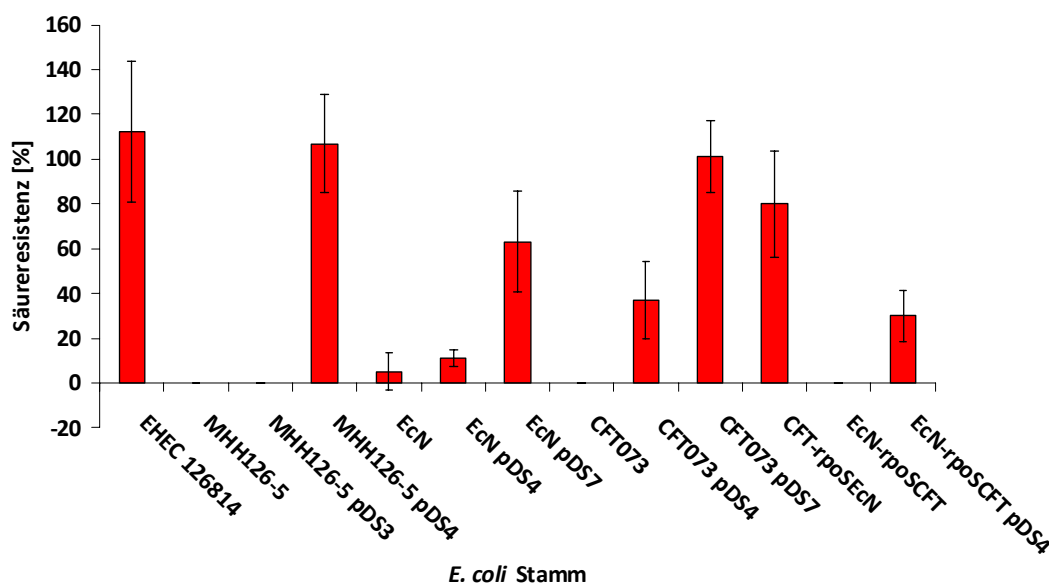


Abbildung 4. 10 Korrelation von Säureresistenz und *rpoS*-Genotyp verschiedener *E. coli*

Dargestellt ist die Überlebensrate verschiedener *E. coli*-Stämme aus der exponentiellen Wachstumsphase in LB-Medium mit pH 7 nach einer 2-stündigen Exposition in LB-Medium mit pH 2,5. Sie wird als Säureresistenz in Prozent der Einsaat des jeweiligen Stamms zum Zeitpunkt 0 min der Säureexposition angegeben. Das säureresistente Patientenisolat EHEC 126814 und die korrespondierende *rpoS*-Deletionsmutante *E. coli* MHH126-5 dienen als Kontrollstämmen. Die Komplementation der Deletionsmutante mit pDS3 zeigt ein nicht-funktionelles *rpos* des uropathogenen Stamms *E. coli* CFT073 im Vergleich zum voll funktionsfähigen *rpoS* von EcN (pDS4). Der EcN-Wildtypstamm ist nur gering säureresistent. Komplementationen mit *rpoS* von EcN mit niedriger oder hoher Kopienzahl (pDS4 bzw. pDS7) führen zu mäßiger bis moderater Säureresistenz. Der säureempfindliche Wildtyp *E. coli* CFT073 wird durch Komplementation mit pDS4 bzw. pDS7 moderat bis resistent gegenüber Säure. Die Genaustauschmutante *E. coli* CFT-rpoS^{EcN} ist säureresistent, während EcN-rpoS^{CFT} die Säureexposition nicht überlebt und nach Komplementation mit pDS4 nur mäßige Resistenz gegenüber Säure aufweist. EHEC 126814: Wildtyp, säureresistent; *E. coli* MHH126-5: *rpoS*-Deletionsmutante von EHEC 126814, säureempfindlich; EcN: Probiotikum *E. coli* Nissle 1917, Wildtyp; *E. coli* CFT073: UPEC, Wildtyp; pDS3: Plasmid mit *rpoS* und zugehörigem Promotor von *E. coli* CFT073, niedrige Kopienzahl; pDS4: Plasmid mit *rpoS* und zugehörigem Promotor von EcN, niedrige Kopienzahl; pDS7: Plasmid mit *rpoS* und zugehörigem Promotor von EcN, hohe Kopienzahl; EcN-rpoS^{CFT}: Genaustauschmutante EcN mit *rpoS* von *E. coli* CFT073; *E. coli* CFT-rpoS^{EcN}: Genaustauschmutante *E. coli* CFT073 mit *rpoS* von EcN.

Der Kontrollstamm EHEC 126814 zeigt eine hohe Säureresistenz, die teilweise durch das Wachstum im sauren Medium über 100% beträgt, während die *rpoS*-Deletionsmutante *E. coli* MHH126-5 vollkommen säureempfindlich ist. Der Wildtypstamm EcN ist mit durchschnittlich 5% überlebenden Bakterien schwach resistent gegenüber Säure, *E. coli* CFT073-Wildtyp ist dagegen völlig säureempfindlich. Die Komplementation der *rpoS*-Deletionsmutante *E. coli* MHH126-5 mit pDS3 zeigt, dass das *rpoS* von *E. coli* CFT073 funktionslos ist, was die Ergebnisse der Sequenzierung bestätigt und auch die Säureempfindlichkeit des Wildtyp-Stamms erklärt. Die Genaustauschmutante EcN-*rpoS*^{CFT} entspricht damit funktionell einer *rpoS*-Deletionsmutante. Komplementation von *E. coli* MHH126-5 mit pDS4 dagegen zeigt, dass EcN ein voll funktionsfähiges *rpoS* besitzt, dessen Genprodukt Säureresistenz vermittelt. Die Komplementation von EcN Wildtyp mit seinem eigenen *rpoS* mit niedriger oder hoher Kopienzahl in Form von pDS4 oder pDS7 verbessert die Säureresistenz abhängig von der Kopienzahl schwach bis mäßig. Die Komplementation von *E. coli* CFT073 mit pDS4 und pDS7 führt zu einer mittleren bis vollständigen Säureresistenz. Auch die Genaustauschmutante *E. coli* CFT-*rpoS*^{EcN} mit dem funktionsfähigen *rpoS* von EcN ist säureresistent. Die Genaustauschmutante EcN-*rpoS*^{CFT} zeigt kein Wachstum in saurem Medium, und die Komplementation mit pDS4 führt nur zu einer mäßigen Säuretoleranz. Nicht abgebildet sind die Kontrollstämme, die mit den Plasmiden pBR322 bzw. pUC19 transformiert waren. Die replizierten Plasmide und die zugesetzten Antibiotika haben keinen Einfluss auf das Wachstum und die Säureresistenz im Vergleich zu den in Abbildung 4. 10 dargestellten Wildtyp-Stämmen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass EcN ein funktionsfähiges *rpoS* besitzt, dessen Expression wahrscheinlich streng reguliert wird, da auch durch die Komplementationen sowohl im Wildtyp als auch in der Genaustauschmutante EcN-*rpoS*^{CFT} keine vollständige Säureresistenz erreicht wird. *E. coli* CFT073 zeigt gegenüber EcN durch Komplementation und Genaustausch mit einem funktionellen *rpoS* gesteigerte Säureresistenz.

Es stellt sich die Frage, ob die Anpassung an ein saures Milieu die Säureresistenz von EcN erhöht. Dazu wird der Säureresistenztest mit einer Kultivierung der Stämme bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase statt in LB-Medium mit pH 7 in LB-Medium

mit pH 5,5 durchgeführt und die Überlebensrate der Bakterien nach zweistündiger Exposition in LB-Medium mit pH 2,5 bestimmt (3.5). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4. 11 dargestellt.

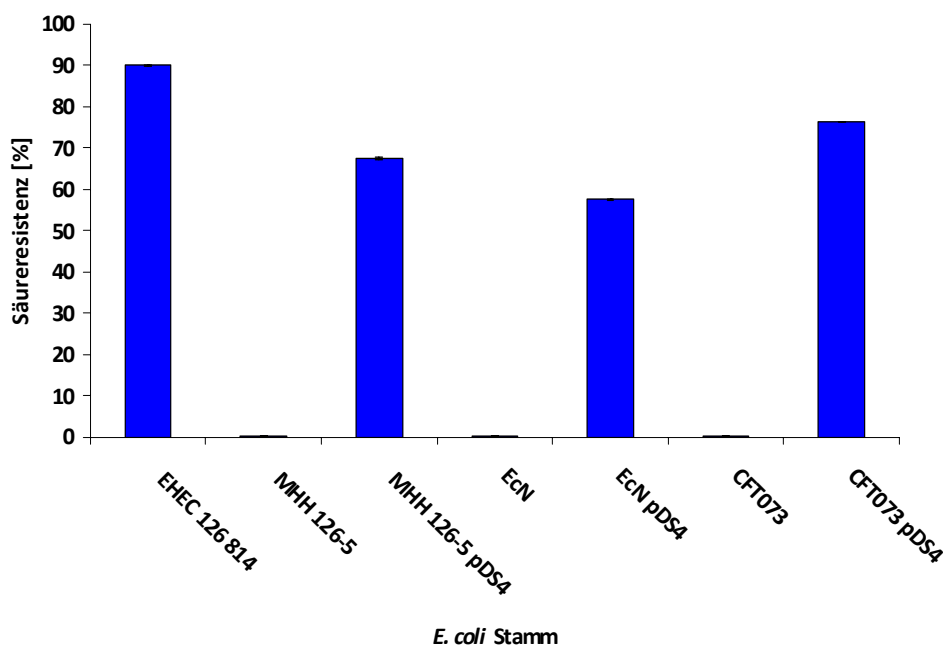


Abbildung 4. 11 Korrelation von Säureresistenz und *rpoS*-Genotyp nach Säureadaptation

Das Diagramm zeigt die Überlebensrate verschiedener Bakterienstämme aus der exponentiellen Wachstumsphase in LB-Medium mit pH 5,5 nach einer 2-stündigen Exposition in LB-Medium mit pH 2,5. Das vorausgegangene Wachstum in Medium mit pH 5,5 dient der Adaptation an das saure Milieu. Der säureresistente EHEC 126814 und die korrespondierende *rpoS*-Deletionsmutante *E. coli* MHH126-5 sind Kontrollstämme bezüglich der Säureresistenz und -empfindlichkeit. EcN Wildtyp ist kaum säureresistent. Die Komplementation von *E. coli* MHH 126-5, EcN und *E. coli* CFT073 mit pDS4 bewirkt bei allen Stämmen eine mittlere bis starke Säureresistenz. Die Mittelwerte der Daten stammen aus drei unabhängigen Versuchen. Die Standardabweichung für alle Messdaten ist <1.

EHEC 126814: Wildtyp, säureresistent; *E. coli* MHH126-5: *rpoS*-Deletionsmutante von EHEC 126814, säureempfindlich; EcN: Probiotikum *E. coli* Nissle 1917, Wildtyp; *E. coli* CFT073: UPEC, Wildtyp; pDS4: Plasmid mit *rpoS* und zugehörigem Promotor von EcN, niedrige Kopienzahl.

Wie bei der Kultivierung in LB-Medium mit pH 7 ist die Säureresistenz des EcN Wildtyps auch nach der Säureadaptation gering (Abbildung 4. 10). Die *rpoS*-Deletionsmutante *E. coli* MHH-126-5 und *E. coli* CFT073 sind ebenfalls wie zuvor empfindlich gegenüber einer Säureexposition. Die mit pDS4 komplementierten Stämme EcN und *E. coli* CFT073 zeigen eine bessere Überlebensrate (ca. 60% für EcN, ca. 75% für *E. coli* CFT073) als im konventionellen Säureresistenztest. Der Stamm *E. coli* MHH126-5 pDS4 weist dagegen nach der Säureexposition eine niedrigere Überlebensrate als im konventionellen Säureresistenztest auf. Die Adaptation an das

saure Medium durch vorhergehende Inkubation in Medium mit pH 5,5 führt demnach bei den komplementierten Wildtyp-Stämmen zu einer erhöhten Säureresistenz, während der Wildtyp-Stamm EcN keine Veränderungen im Vergleich zum konventionellen Säureresistenztest zeigt. Die Säureadaptation beeinflusst die Regulation des *rpos* in EcN nur bei höherer Kopienzahl, sie hat jedoch keinen Einfluss auf die Säureresistenz des Wildtypstamms EcN.

4.2 Molekulare Analyse probiotischer Eigenschaften von EcN

4.2.1 Einfluss von *E.coli*-Mutanten auf die Genregulation in Lovo-Zellen

Die *in vitro* Co-Kultur von Bakterien mit eukaryotischen Zellen führt in diesen zur Veränderung der Genexpression verschiedener immunmodulatorischer Moleküle. Ukena et al. haben gezeigt, dass die 6-stündige Inkubation von EcN mit Lovo-Zellen zu einem Anstieg der Expression von MCP-1 und ZO-1 in Lovo-Zellen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gegenüber der Inkubation mit *E. coli* MG1655 führt (Ukena et al., 2005; Ukena et al., 2007). Um den Einfluss von RpoS und den EcN-spezifischen Plasmiden pMUT1 und pMUT2 in Bezug auf die Genexpression von MCP-1 und ZO-1 in Lovo-Zellen zu testen, werden Co-Kulturexperimente von Lovo-Zellen mit verschiedenen EcN-Mutanten und den korrespondierenden *E. coli* CFT073-Mutanten durchgeführt. Folgende Stämme werden dabei eingesetzt:

EcN Wildtyp, *E. coli* MHH073-3, EcN-rpoS^{CFT}, *E. coli* MHH073-3-rpoS^{EcN} und die EcN-Plasmidmutanten EcNΔpMUT1, EcNΔpMUT2 und EcNΔpMUT1+2.

4.2.1.1 Erzeugung von *E. coli*-Mutanten für Co-Kulturexperimente

Die Generierung der Genaustauschmutante EcN-rpoS^{CFT} mit der Suizidvektormethode ist in 4.1.7 beschrieben. Für den *rpoS*-Genaustausch von *E. coli* CFT073 wird statt des Wildtypstamms die *hlyA*-Deletionsmutante *E. coli* MHH073-3 verwendet. Diese Mutante sezerniert kein porenbildendes, cytotoxisches Hämolyisin und kann deshalb in Co-Kultur-Experimenten problemlos eingesetzt werden. Die Generierung der Mutante erfolgt mit dem Plasmid pDS10 unter Anwendung der Suizidvektormethode (3.4.2).

Die Plasmidmutanten EcNΔpMUT1, EcNΔpMUT2 und EcNΔpMUT1+2 werden durch Entfernung einer oder beider stammspezifischen Plasmide von EcN ebenfalls mit der Suizidvektormethode erzeugt. Dazu werden mit den Primern Muta11 und Muta12 sowie Muta8a und Muta10a ein 750bp- bzw. 1000bp-Fragment aus den Plasmiden pMUT1 und pMUT2 amplifiziert und nach Restriktionsverdau mit *SacI* und *XbaI* in den Suizidvektor pMHH1 kloniert. Die daraus hervorgehenden Plasmide pDS5 und pDS6 werden zunächst einzeln für die Konjugation und Generation von EcNΔpMUT1 und EcNΔpMUT2 verwendet. Aus der Plasmidmutante EcNΔpMUT1 wird mit dem Suizidvektor pDS6 anschließend die Plasmid-Doppelmutante EcNΔpMUT1+2 generiert.

4.2.1.2 mRNA-Expression in Lovo-Zellen

Die mRNA-Expression von MCP-1 und ZO-1 in Lovo-Zellen nach Inkubation mit EcN und korrespondierenden Mutanten wird mittels quantitativer Realtime-PCR bestimmt (3.3.6). Die mRNA-Mengen werden dafür auf Expressionsniveau von Lovo-Zellen nach Inkubation mit EcN normalisiert.

In Abbildung 4. 12 sind die Ergebnisse der Co-Kulturversuche dargestellt. In zwei unabhängigen Experimenten ist die mRNA-Expression von MCP-1 in Lovo-Zellen nach Inkubation mit den Mutanten *E. coli* MHH073-3, EcN-rpoS^{CFT} und *E. coli* MHH073-3-rpoS^{EcN} gegenüber EcN vermindert. Dagegen steigt die mRNA-Expression für ZO-1 nicht nur nach der Inkubation mit EcN wie erwartet an, sondern auch bei der Genaustauschmutante *E. coli* MHH073-3-rpoS^{EcN}. Die mRNA-Expression in Lovo-Zellen durch die Plasmidmutanten EcNΔpMUT1, EcNΔpMUT2 und EcNΔpMUT1+2 weist im Vergleich zum Wildtyp keine signifikanten Unterschiede auf (Daten nicht dargestellt).

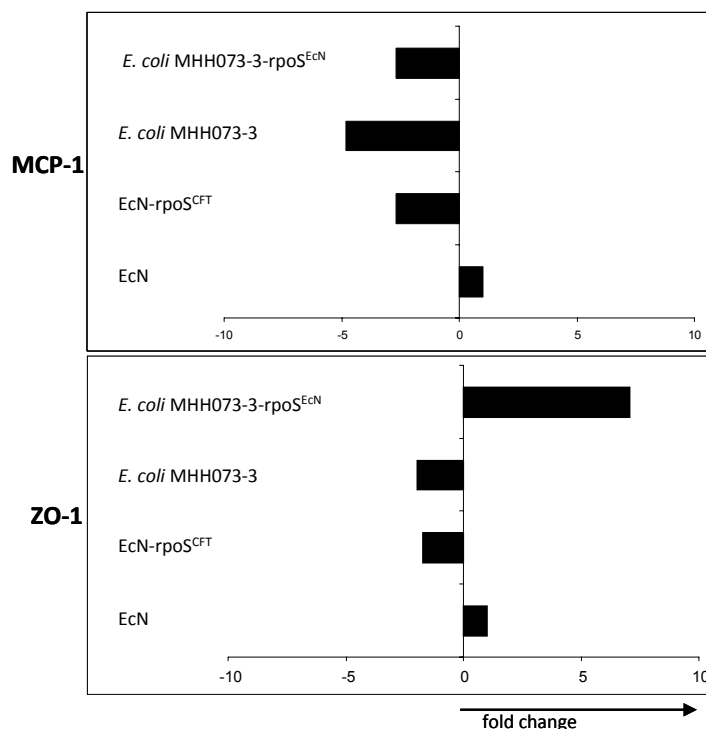


Abbildung 4. 12 Regulation von MCP-1 und ZO-1 in Lovo-Zellen nach Co-Kultur mit *E. coli*

In Co-Kulturexperimenten mit verschiedenen *E. coli*-Stämmen zeigen Lovo-Zellen nach sechs Stunden Inkubation einen Anstieg der mRNA-Expression von MCP-1 in der quantitativen Realtime-PCR in der Gegenwart von EcN. Die Stimulation durch *E. coli* MHH073-3, der *hlyA*-Deletionsmutante von *E. coli* CFT073, und den Genaustauschmutanten *E. coli* MHH073-3-rpoS^{EcN} und EcN-rpoS^{CFT} führt zu einer Verminderung der mRNA-Expression. Eine verstärkte Expression der mRNA des Tight-junction-Proteins ZO-1 wird durch Co-Inkubation mit EcN und *E. coli* MHH073-3-rpoS^{EcN} beobachtet. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten. Die mRNA-Mengen werden auf Expressionsniveau von Lovo-Zellen nach Inkubation mit EcN normalisiert (fold change=1).

Ein funktionelles *rpoS* sowohl in EcN als auch in *E. coli* MHH073-3 hat also einen Einfluss auf die vermehrte Expression von ZO-1 in Lovo-Zellen. Die Expression von MCP-1 scheint dagegen durch einen EcN-spezifischen Faktor verstärkt zu werden, der möglicherweise durch RpoS reguliert wird, da MCP-1 sowohl in den *E. coli* CFT073-Mutanten als auch in dem Stamm EcN-rpoS^{CFT}, der als funktionelle *rpoS*-Deletionsmutante anzusehen ist, vermindert exprimiert wird.

Die EcN-spezifischen Plasmide pMUT1 und pMUT2 sind nicht in die Regulation der Genexpression von MCP-1 und ZO-1 in Lovo-Zellen involviert.

4.2.2 Analyse EcN-spezifischer Eigenschaften mit Deletionsmutanten

Für die weitere molekulare Analyse von EcN, insbesondere in Bezug auf den Einfluss der genomischen Inseln auf den probiotischen Charakter des Stamms, werden verschiedene Mutanten mittels narbenloser Deletion (3.4.3) erzeugt. Mit dieser Methode werden Sequenzen bis zu einer Länge von 96 kb deletiert. Grundlage für die Deletionsbereiche sind die bereits veröffentlichten genomischen Inseln von EcN, GEI I und GEI II, das Eisenaufnahmesystem Yersiniabactin ybt (Grozdanov et al., 2004), die Peptid-Polyketid-Hybrid-Region pks (Nougayrede et al., 2006) sowie große Regionen, die Transposasen (trd) oder Prophagen (phr) enthalten. Die einzelnen Deletionsbereiche werden mit ND bezeichnet und fortlaufend durchnummeriert. Die Mutanten selbst werden mit EcNDS (EcN Deletion Strain) bezeichnet und fortlaufend durchnummeriert. Durch Sequenzierung der Deletionsbereiche inklusive der homologen Sequenzen Block A und Block B werden die Deletionen der EcNDS-Mutanten überprüft. Die verwendeten Primer sind im Anhang (8.2) aufgeführt. Alle Stämme werden anschließend einer biochemischen Charakterisierung und einer Resistenzbestimmung (VITEK2, BioMerieux, Nürtingen) unterzogen. Die getesteten biochemischen Parameter und Antibiotika sowie die Ergebnisse für die Stämme EcN und EcNDS1-3 sind in Tabelle 4. 7 und Tabelle 4. 8 aufgeführt. Bei allen Testungen und auch bei der Überprüfung der Wachstumseigenschaften *in vitro* in MOPS-Minimalmedium (3.1.3) sind keine signifikanten Unterschiede zum Wildtypstamm EcN zu beobachten. Zudem sind alle Stämme empfindlich gegenüber den getesteten Antibiotika (Tabelle 4. 8). Die elf bisher generierten Einzel- und Mehrfachmutanten sind in Tabelle 4. 6 aufgelistet. Die Stämme EcNDS4 bis EcNDS11 wurden im Rahmen der Diplomarbeit von A. Zschüttig, TU Dresden, hergestellt und überprüft.

Um einen Effekt dieser Deletionen auf die probiotischen Eigenschaften von EcN feststellen zu können, werden die Deletionsmutanten im Adhärenz- und im Invasionsassay (3.6.1, 3.6.2) mit EcN Wildtyp verglichen.

Tabelle 4. 6 EcN-Deletionsmutanten EcNDS1 bis EcNDS11

Stamm	ND	Deletions-region	Deletion [kb]	Flankieren-des Gen 1	Flankieren-des Gen 2	Flankierende Sequenz 1 (5'→3')	Flankierende Sequenz 2 (5'→3')
EcNDS1	ND1	GEI I	95	ECN3088	ECN3198	GGATAGTGTTCCTTGCGATAA TATCATTACAG	CTGGCAGTGTTTAACCCGGC ACCGGTGGTC
EcNDS2	ND2	GEI II	94,7	ECN0861	ECN0966	AATGGCAAGAAGTGGATTG AAGTCCAGAA	GCCCGGATTTTTCGCTCAGT CAGTGCCAT
EcNDS3	ND3	pks	54,5	ECN2000	ECN2028	GGGATCGCCTTTGCCAGTAA GTGGCTAATA	CCGACTGAACTACAGAGGAA TCGTGAGAAC
EcNDS4	ND1	GEI I	189,7	ECN3088	ECN3198	GGATAGTGTTCCTTGCGATAA TATCATTACAG	CTGGCAGTGTTTAACCCGGC ACCGGTGGTC
	ND2	GEI II		ECN0861	ECN0966	AATGGCAAGAAGTGGATTG AAGTCCAGAA	GCCCGGATTTTTCGCTCAGT CAGTGCCAT
EcNDS5	ND1	GEI I	149,5	ECN3088	ECN3198	GGATAGTGTTCCTTGCGATAA TATCATTACAG	CTGGCAGTGTTTAACCCGGC ACCGGTGGTC
	ND3	pks		ECN2000	ECN2028	GGGATCGCCTTTGCCAGTAA GTGGCTAATA	CCGACTGAACTACAGAGGAA TCGTGAGAAC
EcNDS6	ND2	GEI II	149,2	ECN0861	ECN0966	AATGGCAAGAAGTGGATTG AAGTCCAGAA	GCCCGGATTTTTCGCTCAGT CAGTGCCAT
	ND3	pks		ECN2000	ECN2028	GGGATCGCCTTTGCCAGTAA GTGGCTAATA	CCGACTGAACTACAGAGGAA TCGTGAGAAC
EcNDS7	ND3	pks	86,4	ECN2000	ECN2028	GGGATCGCCTTTGCCAGTAA GTGGCTAATA	CCGACTGAACTACAGAGGAA TCGTGAGAAC
	ND4	ybt		ECN2038	ECN2052	TCAGAAGAAATCAATTCGCG TATTGATACC	CTGTACCGGGTTGATATTCAG CGCCAGCAT
EcNDS8	ND1	GEI I	244,2	ECN3088	ECN3198	GGATAGTGTTCCTTGCGATAA TATCATTACAG	CTGGCAGTGTTTAACCCGGC ACCGGTGGTC
	ND2	GEI II		ECN0861	ECN0966	AATGGCAAGAAGTGGATTG AAGTCCAGAA	GCCCGGATTTTTCGCTCAGT CAGTGCCAT
	ND3	pks		ECN2000	ECN2028	GGGATCGCCTTTGCCAGTAA GTGGCTAATA	CCGACTGAACTACAGAGGAA TCGTGAGAAC
EcNDS9	ND5	phr	43,9	ECN2184	ECN2239	GGGTAACTTACTGATTTTAA TAATCCTC	ATTTAGGATGCGACCATTGTG GCAAACCGA
EcNDS10	ND4	ybt	30,1	ECN2038	ECN2052	TCAGAAGAAATCAATTCGCGT ATTGATACC	CTGTACCGGGTTGATATTCAG CGCCAGCAT
EcNDS11	ND6	trd1	41,9	ECN4451	ECN4501	TTATAAATTGCCACGAATTC TTTTACCATT	TGAGACATCGCCTCGTATAC CCTTTTGTA

EcNDS: EcN Deletionsstamm; ND: Nissle-Deletion; GEI I und GEI II: genomische Inseln I und II in EcN nach Grozdanov *et al.* (Grozdanov et al., 2004); pks Peptid-Polyketid-Hybrid Colibactin nach Nougayrede *et al.* (Nougayrede et al., 2006); ybt: Yersiniabactin (Grozdanov et al., 2004); phr: Phagenregion; trd: Transposaseregion

Tabelle 4. 7 Testung biochemischer Parameter von EcN, EcNDS1, EcNDS2 und EcNDS3

Substrat	Abkürzung	Testergebnis
2,4,4'-Trichlor-2'-Hydroxydiphenylether	DP3	-
Harnstoff	URE	-
Maltose	MLT	+
Inositol	INO	-
L-Arabinose	ARA	+
Glucose	OFG	+
Citrat	CIT	-
Mannose	MAN	+
Adonitol	ADO	-
Glucose	GLU	+
Tryptophan	GC	+
Malonat	MAL	-
Xylose	XYL	+
p-Cumarinsäure	COU	+
Arginin	ARG	+
Acetamid	ACE	-
Tryptophan	TDA	-
Raffinose	RAF	-
Natriumthiosulfat, Lactat, Eisensulfat	H ₂ S	-
Lysin	LYS	+
Esculin	ESC	-
Polymyxin B	PXB	-
Sorbit	SOR	+
O-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid, Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid	ONP	+
Ornithin	ORN	+
Indoxyl-β-D-Glucose	PLI	-
Lactose	LAC	+
Saccharose	SUC	-
Rhamnose	RHA	+
Oxidase	OXI	-

Tabelle 4. 8 Antibiotogramm der Stämme EcN, EcNDS1, EcNDS2 und EcNDS3

Antibiotikum	MHK (µg/ml)	Ergebnis
Amikacin	≤ 2	Sensibel
Ampicillin	≤ 2	Sensibel
Ampicillin/Sulbactam	≤ 4	Sensibel
Cefazolin	≤ 8	Sensibel
Cefepim	≤ 4	Sensibel
Ceftazidim	≤ 8	Sensibel
Ceftriaxon	≤ 8	Sensibel
Ciprofloxacin	≤ 0,5	Sensibel
Gentamycin	≤ 0,5	Sensibel
Imipinem	≤ 4	Sensibel
Levofloxacin	≤ 1	Sensibel
Nitrofurantoin	≤ 32	Sensibel
Piperacillin/Tazobactam	≤ 8	Sensibel
Tobramycin	≤ 0,5	Sensibel
Trimethoprim-sulfamethoxazol	≤ 10	Sensibel

4.2.3 Adhärenzassay mit EcN Wildtyp und Deletionsmutanten

EPEC sind Erreger der Säuglingsenteritis (Tabelle 1. 1). Sie binden mit Hilfe des Adhärenzproteins Intimin fest an intestinale Epithelzellen. Dadurch wird der Bürstensaum der Epithelzellen zerstört und eine Diarrhö ausgelöst. Die Inhibition der Adhärenz pathogener Bakterien ist ein Wirkmechanismus probiotischer Bakterien (Tabelle 1. 3). Wie bei Kleta et al. (Kleta et al., 2006) gezeigt wurde, vermindert die Inkubation intestinaler Epithelzellen mit EcN *in vitro* bei nachfolgender Infektion der Zellen mit EPEC deren Adhärenzeffizienz. Mit Hilfe der EcN-Deletionsmutanten EcNDS1 bis EcNDS11 (4.2.2; Tabelle 4. 6) soll der Einfluss der GI und Prophagen auf die probiotische Aktivität im Vergleich zu EcN Wildtyp ermittelt werden. Zur Infektion der humanen Kolonepithelzellen Caco-2 wird der EPEC-Stamm *E. coli* E2348/69 eingesetzt, der durch Transformation von pBR322 ampicillinresistent ist.

Die Adhärenzeffizienz wird ermittelt, indem die Adhärenz von EPEC an Caco-2-Zellen auf 100% gesetzt wird und der prozentuale Anteil der adhärenenten EPEC nach Vorinkubation mit den zu testenden *E. coli*-Stämmen im Vergleich dazu bestimmt wird.

Die unspezifische Anheftung der Bakterien an die Oberfläche der Zellkulturplatte erweist sich als gering und ist zu vernachlässigen.

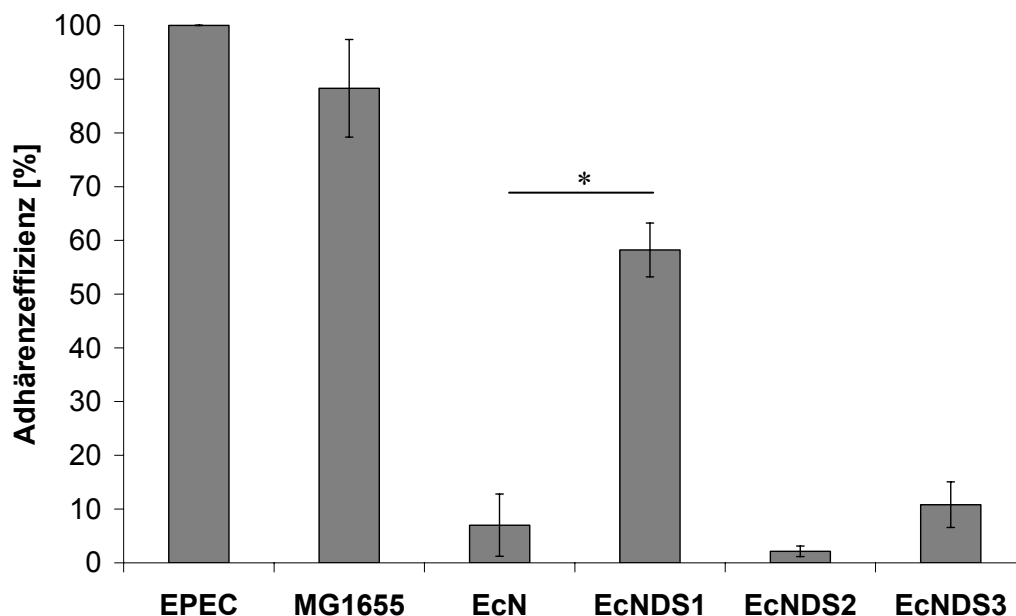


Abbildung 4. 13 Einfluss verschiedener *E. coli* auf die Adhärenz von EPEC an Caco-2-Zellen

Konfluente Caco-2-Zellen werden mit *E. coli*-Stämmen (MOI 100) inkubiert. Nach Entfernung nicht adhärenter Bakterien durch Waschen werden die Zellen mit EPEC E2348/69 pBR322 (MOI 100) infiziert. Nach weiteren drei Stunden Inkubation werden die Zellen gewaschen, lysiert und die Kbe/ml der adhärenen EPEC durch Ausplattieren auf LB/Amp-Agar bestimmt.

Die Adhärenzeffizienz von EPEC ohne Vorinkubation entspricht 100% (EPEC). *E. coli* MG1655 dient als Negativkontrolle, da die Vorinkubation keine signifikante Reduktion der Adhärenzeffizienz von EPEC bewirkt. EcN reduziert die Adhärenzeffizienz von EPEC dagegen erheblich. Die Deletionsmutanten EcNDS2 und EcNDS3 vermindern ebenfalls die Adhärenzeffizienz von EPEC. EcNDS1 bewirkt eine Aufhebung des Effekts, die Adhärenzeffizienz der EPEC ist wieder deutlich höher. Die unspezifische Adhärenz der EPEC an die Zellkulturplatte wird in einem zellfreien Ansatz ermittelt und ist zu vernachlässigen (Daten nicht dargestellt). Die Daten stammen aus 3 unabhängigen Versuchen. Die Standardabweichungen sind angegeben. Die Signifikanz der Änderung der Adhärenzeffizienz im Vergleich zu EcN Wildtyp ist mit dem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,001$).

EcN-Deletionsmutanten: EcNDS1 (Δ GEI I); EcNDS2 (Δ GEI II); EcNDS3 (Δ pks).

Die Adhärenz des EPEC-Stamms *E. coli* E2348/69 pBR322 nach Vorinkubation der Zellen mit EcN ist gegenüber der Vorinkubation mit *E. coli* K-12 als Kontrollstamm deutlich vermindert (Abbildung 4. 13). Der Adhärenzassay kann also mit humanen intestinalen Epithelzellen anstelle der bei Kleta *et al.* (Kleta et al., 2006) verwendeten intestinalen Epithelzellen aus Schweinen durchgeführt werden und liefert vergleichbare Ergebnisse.

Der Einfluss der GI und Prophagen von EcN auf die Adhärenzeffizienz der EPEC wird in drei unabhängigen Experimenten mit den Deletionsmutanten EcNDS1, EcNDS2 und EcNDS3 (Tabelle 4. 6) jeweils in Doppelbestimmungen untersucht. Signifikanzen in der Änderung der Adhärenzeffizienz im Vergleich zu EcN Wildtyp werden mit dem Student's t-Test ermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass im Vergleich zu EcN Wildtyp die Mutante EcNDS1 (Δ GEI I) eine Umkehr des Effekts bewirkt. Die in der Diplomarbeit von A. Zschüttig (TU Dresden) dargestellten Ergebnisse mit den weiteren Deletionsmutanten EcNDS4-11 zeigen, dass EcNDS5 (Δ GEI I, pks), EcNDS8 (Δ GEI I, GEI II, pks) und EcNDS11 (Δ trd1) ebenfalls eine Umkehr des Effekts bewirken. EPEC ist nach der Inkubation von Caco-2-Zellen mit diesen Stämmen wieder in der Lage, effektiv an die Zellen zu adhären. Die Vorinkubation mit der Deletionsmutante EcNDS4 (Δ GEI I, GEI II) hat einen ähnlichen, jedoch weniger starken Effekt auf die Zelladhäsion der EPEC. Der Unterschied zum Wildtyp EcN ist jedoch signifikant. Bis auf EcNDS11 weisen alle Mutanten eine Deletion der GEI I auf. Die übrigen Deletionsmutanten EcNDS2 (Δ GEI II), EcNDS3 (Δ pks), EcNDS6 (Δ GEI II, pks), EcNDS7 (Δ ybt, pks), EcNDS9 (Δ pkr) und EcNDS10 (Δ ybt) führen ebenso wie EcN zu einer deutlich sichtbaren Reduktion der Adhärenzeffizienz von EPEC.

Die Vorinkubation der Caco-2-Zellen mit steriltfiltrierten Kulturüberständen von *E. coli* MG1655, EcN und den Deletionsmutanten EcNDS1 (Δ GEI I), EcNDS2 (Δ GEI II) und EcNDS4 (Δ GEI I, GEI II) statt mit Bakterien zeigt keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Adhärenz von EPEC. In allen drei unabhängigen Versuchen binden *E. coli* E2348/69 mit hoher Effizienz an die konfluenten Zellen. Lösliche Faktoren von EcN sind in diesem Zellkulturmodell nicht für die Adhärenzeffizienz von EPEC an intestinale Epithelzellen verantwortlich.

4.2.4 Invasivität von EcN in Caco-2 Zellen

Neben pathogenen *E. coli* (Tabelle 1. 1) gehören auch *Salmonella typhimurium* und *Salmonella enteritidis* zu den Enteritis-Erregern. Ihre Übertragung erfolgt fäkal-oral über kontaminierte Lebensmittel. Salmonellen besitzen die Fähigkeit, durch Ausbildung von Invasinen die intestinalen Epithelzellen zu penetrieren. An der Lamina propria des terminalen Ileums werden sie von Makrophagen aufgenommen. Die dort ausgelöste entzündliche Reaktion verursacht Fieber und Diarrhö. Ein Wirkmechanismus

probiotischer Bakterien ist neben der Inhibition der Adhärenz auch die Inhibition der Invasion pathogener Bakterien (Tabelle 1. 3). Wie bei Kleta et al. (Kleta et al., 2006) gezeigt wurde, vermindert die Inkubation intestinaler Epithelzellen vom Schwein mit EcN *in vitro* bei nachfolgender Infektion der Zellen mit *S. typhimurium* die Invasionseffizienz der Salmonellen. Mit Hilfe der EcNDS-Mutanten soll im Invasionsassay der Einfluss der GI und Prophagen von EcN (4.2.2) auf die probiotische Aktivität bezüglich der Invasionshemmung untersucht werden. Zur Infektion der humanen Kolonepithelzellen Caco-2 wird ein mikrobiologisch vollständig charakterisiertes *S. typhimurium*-Patientenisolat eingesetzt.

4.2.4.1 Invasionsassay mit EcN Wildtyp und Deletionsmutanten

Im Invasionsassay mit humanen intestinalen Epithelzellen wird die Invasionseffizienz der Salmonellen nach Inkubation mit verschiedenen *E. coli*-Stämmen in Relation zur Invasivität ohne Vorinkubation dargestellt. In drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung werden die Stämme *E. coli* MG1655 und EcN sowie die EcN-Deletionsmutanten EcNDS1, EcNDS2 und EcNDS3 (Tabelle 4. 6) zur Vorinkubation der Caco-2-Zellen eingesetzt (Abbildung 4. 14). Die Invasivität von *S. typhimurium* ist nach Inkubation mit EcN bis zu 50% vermindert. Jedoch zeigt auch die Vorinkubation mit *E. coli* MG1655 eine Reduktion der Invasivität auf ca. 70%. Zudem waren signifikante Unterschiede zwischen EcN Wildtyp und den Deletionsmutanten nur bei EcNDS1 (Δ GEI I) und EcNDS2 (Δ GEI II) zu erkennen. Diese weisen jedoch keine gemeinsamen Deletionsbereiche auf. Aufgrund starker Schwankungen in der Bestimmung der KbE/ml und der dadurch recht hohen Standardabweichung können keine klaren Aussagen darüber getroffen werden, ob EcNDS3 die Invasivität von *S. typhimurium* in Caco-2 Zellen reduzieren kann. Große Schwankungen wurden auch bei der Testung von EcNDS4-11 (Diplomarbeit A. Zschüttig, TU Dresden) ermittelt. Der Assay mit Caco-2-Zellen kann zur Testung der Deletionsmutanten nicht eingesetzt werden.

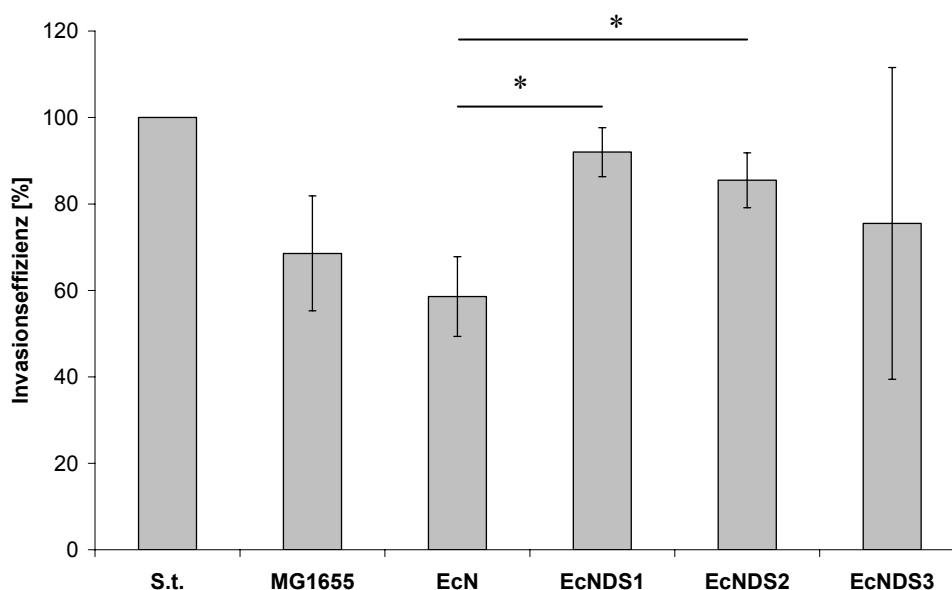


Abbildung 4. 14 Invasionseffizienz von *S. typhimurium* in Caco-2-Zellen nach Inkubation mit *E. coli*

Konfluente Caco-2-Zellen werden mit *E. coli* MG1655, EcN oder EcNDS-Mutanten (MOI 100:1) vorinkubiert. Nach dem Entfernen der Bakterien durch Waschen werden die Zellen mit *S. typhimurium* (MOI 100:1) infiziert. Die Invasionseffizienz ist dargestellt in Prozent relativ zur Invasivität von *S. typhimurium* in Caco-2-Zellen ohne Vorinkubation mit Bakterien (S.t). Die Signifikanz der Änderung der Invasionseffizienz im Vergleich zu EcN Wildtyp wird mit dem Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,01$). Die Invasionseffizienz der Salmonellen ist durch EcN vermindert. EcNDS1 und EcNDS2 zeigen eine Reversion des Effekts von EcN. Die hohe Standardabweichung und der Einfluss des Kontrollstamms *E. coli* MG1655 auf die Invasionseffizienz lassen keine klare Aussage zum Einfluss von EcNDS3 auf die Invasionseffizienz zu. EcN-Deletionsmutanten: EcNDS1 (Δ GEI I); EcNDS2 (Δ GEI II); EcNDS3 (Δ pks)

Bei der Auszählung der intrazellulären Bakterien wird neben den Salmonellen auch ein unerwartetes Wachstum von EcN Wildtyp-Kolonien auf den Agarplatten beobachtet.

Nach dem Ausplattieren der Verdünnungsreihen auf MacConkey-Agar können EcN durch die Fähigkeit der Laktosespaltung als rote Kolonien im Gegensatz zu den farblosen Kolonien der Laktose-negativen Salmonellen identifiziert und mit einer EcN-spezifischen PCR mit den Primern Muta5, Muta6, Muta7 und Muta8 (Blum-Oehler et al., 2003) bestätigt werden. Dies deutet auf das Überleben intrazellulärer EcN hin. Um adhärente EcN als fälschlich invasive Bakterien in dem Assay auszuschließen, werden zum Abtöten extrazellulärer Bakterien die Inkubationszeiten mit Gentamycin verlängert und höhere Konzentrationen des Antibiotikums eingesetzt. Diese Maßnahmen haben keinen Einfluss auf die Ergebnisse, so dass von einem invasiven Potenzial von EcN ausgegangen werden kann.

Nach der Co-Inkubation von Caco-2-Zellen mit EcN, MG1655 oder *S. typhimurium* (ohne nachfolgende Inkubation mit *S. typhimurium*) wird die Invasivität der einzelnen

Stämme untersucht, indem das Wachstum der intrazellulären Bakterien bestimmt wird (3.6.2). Aus dem Zelllysate können neben Salmonellen auch EcN sowie einige Kolonien von *E. coli* MG1655 angezüchtet werden. Wie in Abbildung 4. 15 zu sehen ist, liegt die Invasivität der Salmonellen eine bis eineinhalb log-Stufen über der Invasivität von EcN. Das invasive Potenzial von *E. coli* K-12 ist um eine log-Stufe niedriger als bei EcN. Die ebenfalls getesteten Deletionsmutanten EcNDS1-11 zeigen eine dem Wildtyp EcN vergleichbare Invasivität.

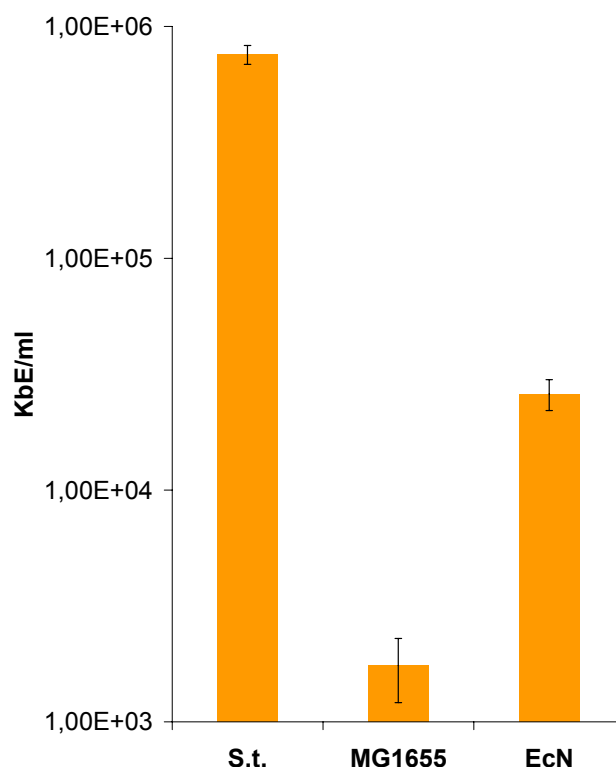


Abbildung 4. 15 Invasivität von EcN, EcNDS und *S. typhimurium* in Caco-2-Zellen

Nach zweistündiger Inkubation der Stämme *S. typhimurium* (S.t.), EcN und *E. coli* MG1655 mit konfluenten Caco-2-Zellen wird die KbE/ml der intrazellulären Bakterien bestimmt. *S. typhimurium* zeigt eine etwa 1,5 log-Stufen höhere Invasivität als EcN. Die Invasivität von *E. coli* MG1655 ist eine log-Stufe niedriger als bei EcN. EcN besitzt demnach ein invasives Potenzial.

EcN offenbart in Caco-2-Zellen im Vergleich zu *E. coli* K-12 als Negativkontrolle und *S. typhimurium* als Positivkontrolle ein invasives Potenzial. Die GI der getesteten Deletionsmutanten haben keinen Einfluss auf die Invasivität von EcN. In weiteren Experimenten soll die Invasivität von EcN in Caco-2-Zellen näher untersucht und verifiziert werden.

4.2.4.2 Nachweis der Invasivität von EcN mittels Konfokalmikroskopie

Für die Darstellung der Bakterien mittels konfokaler Laserscanmikroskopie werden die Bakterien zunächst durch Transformation von Plasmiden fluoreszenzmarkiert. Anschließend wird der Invasionsassay in Chamber SlidesTM mit konfluenten Caco-2-Zellen, EcN pMW211 (DsRed-Expression) und *S. typhimurium* pGFP (GFP-Expression) durchgeführt (3.6.2).

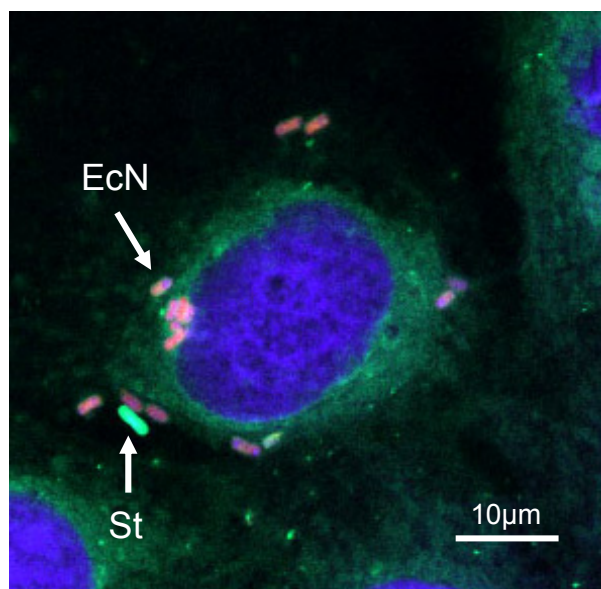


Abbildung 4. 16 Invasivität von EcN und *S. typhimurium* in Caco-2 Zellen

Aufnahmen mit dem konfokalen Laserscanmikroskop zeigen intrazellulär lokalisierte EcN pMW211 und *S. typhimurium* pGFP nach Inkubation mit Caco-2-Zellen. EcN und Salmonellen sind mit Pfeilen markiert. Zellkerne: DAPI-Färbung; Zellmembranen: Färbung mit Vybrant DiO; *S. typhimurium* pGFP: grün (St); EcN pMW211: rot (EcN). Maßstab: 10μm

Die Abbildung 4.16 zeigt, dass sowohl Salmonellen als auch EcN im Zytoplasma der Caco-2 detektiert werden können. Nach der Anfärbung der Zellmembranen wird die intrazelluläre Lokalisation der Bakterien deutlich. Trotz des gleichen Farbkanals für Zellmembranen und GFP-markierte Salmonellen sind die Bakterien gut zu erkennen, da sie im Gegensatz zu den diffus gefärbten Zellmembranen stark leuchtend, kompakt und klar umrissen sind. Der Verdacht der Invasivität von EcN in Caco-2 Zellen *in vitro* ist damit bestätigt.

4.3 *In vivo* Regulation intestinal aktiver Promotoren in EcN

4.3.1 Promotor-Reporter-Fusionsbibliothek von EcN

Die Promotor-Reporter-Fusionsbibliothek von EcN (Promotorbank) dient der Identifikation intestinal *in vivo* regulierter Gene von EcN über die Promotoren, die im Mausmodell exprimiert werden. Diese Gene sind wahrscheinlich mit verantwortlich für den probiotischen Charakter des Stamms. Intestinal *in vivo* aktive Promotoren wiederum sind von großem Interesse für die Expression rekombinanter Proteine durch EcN *in situ*.

Die Promotorbank von EcN, die im Rahmen einer Doktorarbeit (Silvia Nicolaisen, Medizinischen Hochschule Hannover) erstellt wurde, besteht aus ca. 10^6 Klonen, die das Plasmid pMW82 mit einem Fragment genomischer DNA von EcN vor dem promotorlosen *gfp-ova* enthalten (3.7.1). Der tatsächliche Anteil der Klone, die ein Plasmid mit Fragment enthalten, wird stichprobenartig durch PCR mit den Primern pMW82-1 und pMW82-2 (8.2) ermittelt und beträgt etwa 70-85%. Ein Beispiel einer Stichprobe zur Überprüfung von Promotorbank-Klonen ist in Abbildung 4. 17 dargestellt. 13 der 18 getesteten Klone tragen hier Fragmente der Größe zwischen 0,3 und 0,8 kb. Demnach enthalten etwa 72% der Klone ein Plasmid mit Insert.

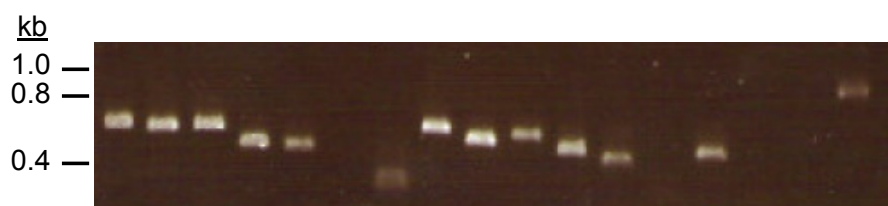


Abbildung 4. 17 Kontrolle klonierter EcN-Fragmente in pMW82 in der Promotorbank von EcN

Stichprobenartig werden Kolonien der Promotorbank von EcN mit den Primern pMW82-1 und pMW82-2 auf die in pMW82 klonierten EcN-Fragmente getestet. 13 von 18 auf dem 1,5%igen Agarosegel aufgetragenen Proben zeigen PCR-Produkte unterschiedlicher Größe. 72% der getesteten Klone enthalten in dieser Probe pMW82 mit einem EcN-Fragment.

Wenn jedem Gen theoretisch ein Promotor zugeordnet wird, sind bei rund 5200 Genen und 70% der Klone mit DNA-Fragmenten alle möglichen Promotoren in der Promotorbank EcN 135-fach repräsentiert. Da etwa die Hälfte aller Gene polycistronisch

abgelesen wird, kann von einer statistisch gesicherten, vielfachen Abdeckung des EcN-Genoms und den Promotoren in der Promotorbank ausgegangen werden.

Enthält ein Fragment aus EcN einen aktiven Promotor, so wird ein mit Ovalbumin (*ova*) fusioniertes, stabiles GFP exprimiert. Die Überprüfung der Promotorbank nach Überlagerung der Fluoreszenz- und Lichtmikroskop-Aufnahme (Olympus BX61, Olympus Biosystems, Hamburg) zeigt *in vitro* GFP exprimierende EcN und nicht fluoreszierende EcN, die im Plasmid pMW82 entweder intestinal *in vivo* aktive Promotoren, Fragmente ohne Promotoren oder Plasmide ohne Fragment enthalten (Abbildung 4. 18). Die Fluoreszenzstärke variiert entsprechend der Promotorstärke.

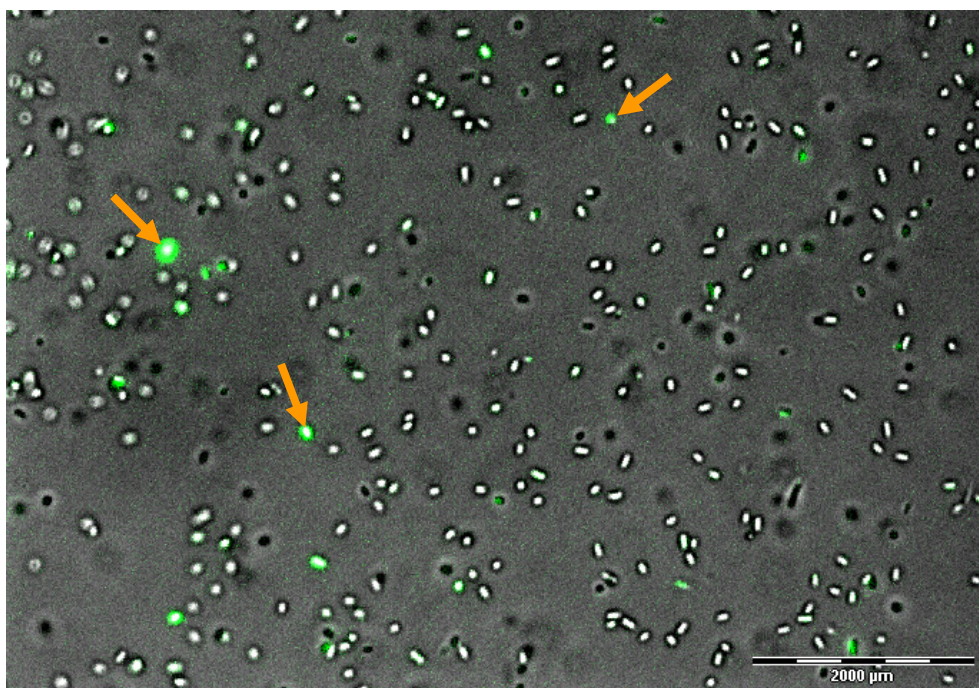


Abbildung 4. 18 EcN Promotorbank unter dem Fluoreszenzmikroskop

Die Abbildung zeigt eine Aufnahme der Promotorbank von EcN aus einer Flüssigkultur. Durch Überlagerung von Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie-Aufnahmen (Olympus BX61, Olympus Biosystems, Hamburg) sind fluoreszierende Bakterien nach Expression von GFP durch aktive Promotoren, hier durch Pfeile markiert, neben EcN ohne GFP-Expression zu sehen.

4.3.2 Sortierung der Promotorbank-Proben mittels Durchflusszytometrie

Zur Identifizierung intestinal *in vivo* aktiver Promotoren werden die Tierexperimente wie bereits beschrieben (3.7.2) durchgeführt. Mit Hilfe des Durchflusszytometers MoFlo (DakoCytomation, Fort Collins, Colorado, USA) werden die GFP-

exprimierenden Bakterien von den nicht fluoreszierenden Bakterien in den verschiedenen Proben getrennt. Als Negativkontrolle dient eine Flüssigkultur von EcN pMW82, dem ursprünglichen, promotorlosen Plasmid. Bei der Zellsortierung wird unter den registrierten Ereignissen keine Fluoreszenz detektiert, d.h. von den promotorlosen Plasmiden wird in EcN kein GFP exprimiert.

Für die Geräteeinstellung („Triggern“) wird eine Flüssigkultur der Promotorbank verwendet. Die zwei verschiedenen Populationen, die aus GFP-exprimierenden und nicht fluoreszierenden EcN bestehen, sind im Diagramm der Abbildung 4. 19 A gut zu unterscheiden. Hier sind in verschiedenen Sortierungen 10-30% der Ereignisse in Form von EcN der Promotorbank als positiv, d.h. fluoreszierend, identifiziert worden.

4.3.2.1 Promotorbank-Experimente mit konventionellen Mäusen

Die erste Sortierung der gepoolten, gefilterten und verdünnten Proben aus Faeces von konventionellen Balb/c-Mäusen erweist sich als schwierig. Die Anzahl der detektierten Ereignisse ist durch die natürlich vorkommende Begleitflora sehr hoch. In zwei Sortierungsdurchgängen werden 1,6-2,7% der Events als positiv, d.h. fluoreszierend identifiziert. In Abbildung 4. 19 B sind die Ereignisse in einem Fluoreszenzhistogramm dargestellt. In der dichten Wolke, die die Ereignisse der verschiedenen Bakterien der Begleitflora und der Promotorbank darstellt, sind die fluoreszierenden Bakterien der Promotorbank rot markiert. Ereignisse, die aufgrund ihrer Größe keine Bakterien sein können, erweisen sich unter dem Fluoreszenzmikroskop als autofluoreszierende Fasern und Partikel aus der Nahrung der Mäuse. Die Reanalyse der sortierten Proben zählt 60-80% positive Ereignisse. Die Fluoreszenz einiger Kolonien, die nach der Sortierung auf LB/Amp-Agar wieder angezüchtet werden, wird durch stichprobenartige Überprüfung mit dem Fluoreszenzmikroskop bestätigt.

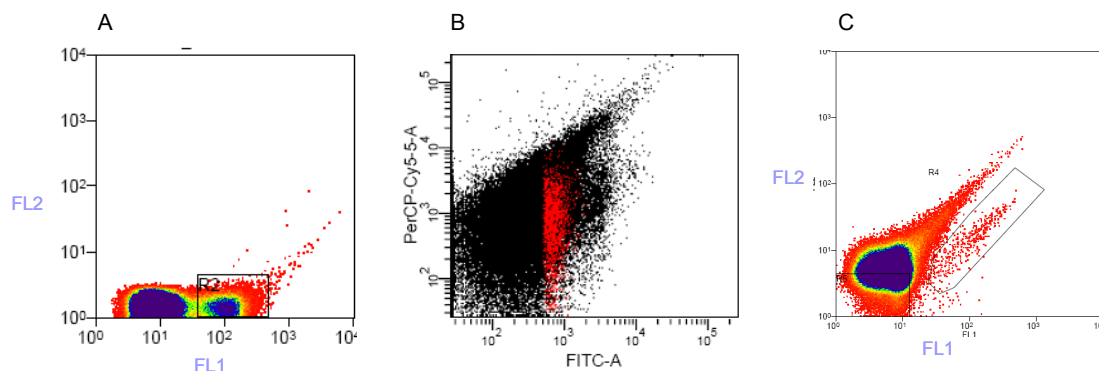


Abbildung 4. 19 Sortierung verschiedener Promotorbank-Proben

Die Diagramme A-C zeigen die Zellsortierung verschiedener Promotorbank-EcN-Proben mit dem Zellsortierer MoFlo in Form von Fluoreszenzhistogrammen. **A:** Promotorbank von EcN; **B:** Faeces von konventionellen Mäusen 24h nach Inokulation der Promotorbank; **C:** Faeces von gnotobiotischen Mäusen 24h nach Inokulation der Promotorbank EcN. Fluoreszenzkanäle der Diagramme A und C: FL1 gegen FL2; Fluoreszenzkanäle des Diagramms B: FITC-A gegen PerCP-Cy5.5A.

Zur Unterscheidung zwischen konstitutiv und intestinal *in vivo* exprimiertem GFP wird ein Aliquot der Klone, die nach der ersten Sortierung auf LB/Amp-Agar gewachsen sind, in LB/Amp-Medium kultiviert und anschließend sortiert. Dabei werden sowohl die fluoreszierenden als auch die „negativen“ Bakterien gesammelt. Etwa $8 \cdot 10^6$ Ereignisse werden für die Fraktion der fluoreszierenden Bakterien, die einen *in vitro* aktiven Promotor als Fragment aus EcN im Plasmid tragen, sortiert. Das entspricht 10% der insgesamt sortierten Bakterien. Die Reanalyse zeigt allerdings nur 65% positive Ereignisse. In der zweiten Fraktion (nicht fluoreszierend) werden $6,3 \cdot 10^7$ Ereignisse gezählt. Diese Fraktion ist mit 98% in der Reanalyse sehr sauber sortiert.

Diese Fraktion der nicht fluoreszierenden EcN wird zur Reinokulation der Mäuse eingesetzt. In der anschließenden Sortierung der Maus-Faeces werden $5,5 \cdot 10^6$ Ereignisse gezählt und gesammelt. Das entspricht etwa 1,4% der sortierten Probe. Die Reanalyse ergibt in diesem Fall 70% positive Ereignisse. Die EcN-Fragmente der aus dieser Sortierung gewonnenen Kolonien werden mittels PCR mit den Primern pMW82-1 und pMW82-2 aus pMW82 amplifiziert und sequenziert. Dabei tragen jedoch nur 25-30% der Promotorbank-Klone EcN-Fragmente. Die restlichen Plasmide enthalten keine EcN-Fragmente, was durch PCR mit den Primern pMW82-3 und pMW82-4 bestätigt wird, mit denen ein mindestens 400 bp großes Fragment des Plasmids pMW82 im Bereich der Insertion amplifiziert wird. Etwa 1000 Inserts aus ca. 4000 Klonen werden mit dem Primer pMW82-1 ansequenziert und diese Sequenzen mittels BLASTn im EcN-Genom identifiziert (4.3.3).

Die Überprüfung der nach der Sortierung aus Faeces auf LB/Amp-Agar gewachsenen Klone erfolgt entweder in einer PCR (3.3.1) mit den EcN-spezifischen Primern Muta5, Muta6, Muta7 und Muta8 (Blum-Oehler et al., 2003) oder mit einem Kolonie-Blot (3.3.11) mit EcN-spezifischen Sonden. Das Ergebnis eines Blots ist in Abbildung 4. 20 zu sehen. Der Kolonie-Blot bestätigt, dass alle auf den Platten gewachsenen Klone ausschließlich EcN der Promotorbank sind und dass durch die Sortierung und Anzucht unter Selektionsdruck (Ampicillin) keine Verunreinigungen durch andere Bakterien enthalten sind. Als Positivkontrolle wird EcN Wildtyp mitgeführt, als Negativkontrolle dient *E. coli* DH5 α .

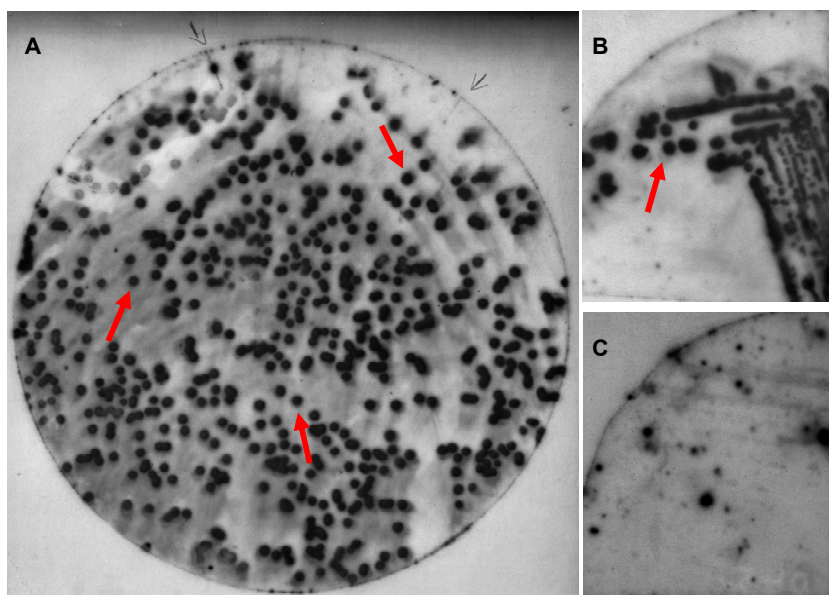


Abbildung 4. 20 Kolonie-Blot sortierter Klone mit EcN-spezifischen Sonden

Nach der ersten Sortierung der Maus-Faeces kann durch den Kolonie-Blot mit EcN-spezifischen DNA-Sonden bestätigt werden, dass alle auf der Agarplatte gewachsenen Kolonien der Promotorbank Kolonien von EcN sind (A). EcN Wildtyp dient als Positivkontrolle (B), *E. coli* DH5 α wird als Negativkontrolle mitgeführt. Einige der durch die Sonden detektierten Kolonien der Promotorbank (A) und der Positivkontrolle (B) sind mit Pfeilen markiert.

4.3.2.2 Promotorbank-Experimente mit gnotobiotischen Mäusen

Die Einstellung zur Sortierung der Faeces aus gnotobiotischen Balb/c-Mäusen ist aufgrund der fehlenden Begleitflora einfacher zu handhaben als die Sortierung der Faeces konventioneller Mäuse (4.3.2.1). Die erste Sortierung ergibt 0,08% fluoreszierende Ereignisse aus der Probe. In der Reanalyse werden jedoch nur 55% positive Ereignisse gezählt. Die Stichproben der nach der Sortierung auf LB/Amp-Agar

gewachsenen Klone zeigen in einer PCR mit den Primern pMW82-1 und pMW82-2a in 95% der Proben Fragmente mit einer Größe von 500-700 bp. Alle Klone werden in der stammspezifischen PCR mit den Primern Muta5, Muta6, Muta7 und Muta8 als EcN identifiziert. Die Sortierung ist trotz der geringen positiven Ereignisse der Reanalyse erfolgreich. Die 45% der nicht-fluoreszierenden Ereignisse in der Reanalyse sind vermutlich auf Nahrungspartikel und einige falsch positiv sortierte Bakterien zurückzuführen.

Die Trennung der intestinal *in vivo* aktiven Promotoren von konstitutiven Promotoren erfolgt durch Kultivierung der Klone der ersten Sortierung in LB/Amp-Medium und anschließender Sortierung mit dem MoFlo. Die Sortierung ergibt für die fluoreszierenden Bakterien, die einen *in vitro* aktiven Promotor im Plasmid pMW82 tragen, etwa $12 \cdot 10^6$ Events. Das entspricht 58% der insgesamt sortierten Bakterien. Die Reanalyse zeigt 82% positive Ereignisse. In der „negativen“ Fraktion werden $8,69 \cdot 10^6$ Events gezählt. Der Anteil der nicht-fluoreszierenden Events in der Reanalyse kann nach einer Resortierung von 50% auf etwa 90% erhöht werden. Die Mikroskopkontrolle zeigt überwiegend starke oder schwächer fluoreszierende Bakterien in der positiven Fraktion und vereinzelt schwach leuchtende Bakterien in der negativen Fraktion. In Stichproben mittels PCR werden etwa 20-30% der EcN-Fragmente aus pMW82 in der negativen Fraktion und 90% in der positiven Fraktion amplifiziert. Alle Klone werden in der EcN-spezifischen PCR mit den Primern Muta5, Muta6, Muta7 und Muta8 positiv getestet.

Die negative Fraktion wird zur Reinokulation in gnotobiotischen Mäusen eingesetzt. Die Maus-Faeces werden sortiert und die fluoreszierenden Bakterien gesammelt. Ein Anteil von 4,4% der Probe wird als positive Fraktion sortiert. Die Reanalysen verschiedener Sortierungen ergeben 67-82% positive Ereignisse. In der Abteilung Genomanalyse des Helmholtz Zentrums für Infektionsforschung, Braunschweig, werden von etwa 4000 Klonen aus dieser Sortierung die EcN-Fragmente mittels PCR mit den Primern pMW82-1 und pMW82-2a amplifiziert und mit pMW82-1 ansequenziert. Etwa 95% der Sequenzen können ausgewertet werden.

4.3.3 Identifizierung intestinal *in vivo* regulierter Genen von EcN

Die Auswertung der sequenzierten Proben aus den Promotorbank-Experimenten mit konventionellen und gnotobiotischen Mäusen (4.3.2.1 und 4.3.2.2) erfolgt durch einen Homologievergleich der Sequenzen mittels BLASTn im Genom von EcN. Die Produkte der Sequenzierungen sind in den meisten Ansätzen zwischen 500 und 700bp lang. Die korrespondierenden Gene werden ermittelt, indem die nächstliegenden Gene zur homologen Sequenz +/- 200 bp gesucht werden. Diese sind in den unten stehenden Tabellen (Tabelle 4. 9 und Tabelle 4. 10) aufgelistet. Zur näheren Charakterisierung sind jeweils die Locus tags, Gennamen und die Beschreibungen der Genprodukte angegeben. Die Gene sind entweder den stammspezifische Genen, den Genen, die in mindestens einem weiteren Stamm vorhanden sind, oder den Genen des Kerngenoms zugeordnet. Die Häufigkeit der Promotorsequenzen dient als Grundlage für die Rangliste. Neben den hier aufgelisteten Genen, deren Promotorsequenzen mindestens zweimal identifiziert werden, gib es für die aktiven Promotoren aus konventionellen Mäusen weitere 81 einzelne Sequenzen. Aus gnotobiotischen Mäusen sind 12 weitere Sequenzen aktiver Promotoren vorhanden. Die aufgelisteten Gene gehören überwiegend zum Kerngenom oder zu den Genen, die in mehreren Stämmen vorhanden sind. Nur wenige Gene werden den stammspezifischen Genen zugeordnet. Einige Promotoren, z.B. die den Genen *malX/malI* und *yafL/yafK* zugeordneten Promotoren, sind sowohl in gnotobiotischen als auch in konventionellen Mäusen aktiv. Viele Gene sind bisher noch nicht näher charakterisiert. Auch Transposasen, Fimbriengene und regulatorische Proteine gehören zu den *in vivo* regulierten Genen. Zur Analyse der Promotoren und ihrer korrespondierenden Gene und zur Bestätigung ihrer Aktivität *in vivo* sind weitere Experimente notwendig.

Tabelle 4. 9 Intestinal *in vivo* regulierte Gene der Promotorbank von EcN in konventionellen Mäusen

#	Locus tag	Gen	Beschreibung	Kategorie	Anzahl
1	ECN2346	<i>sppA</i>	Protease IV	D	295
	ECN2347		Hypothetisches Protein	D	
	ECN2348	<i>ydjA</i>	Putative Nitroreduktase	K	
	ECN2349	<i>selD</i>	Selenophosphatsynthetase	K	
2	ECN3894		Hypothetisches Protein	D	155
	ECN3895		Hypothetisches Protein	D	
	ECN3896		Hypothetisches Protein	D	
3	ECN2505	<i>malX</i>	Phosphotransferasesystem	D	99
	ECN2506	<i>mall</i>	Maltoseregulon regulatorisches Protein	K	
4	ECN4876		Putative Hippuricase	D	12
	ECN4877	<i>sthA</i>	lösliche Pyridinnukleotid-Transhydrogenase	K	
5	ECN1442	<i>yfgE</i>	Putativer DNA-Replikationsfaktor YfgE	K	11
6	ECN3310	<i>mukB</i>	Zellteilungsprotein	K	11
7	ECN4668	<i>fumB</i>	Fumaratehydratase Klasse I	K	11
	ECN4669		Pseudogen K-12	D	
	ECN4670		Pseudogen K-12	S	
8	ECN2720	<i>ycjF</i>	Hypothetisches Protein	K	9
	ECN2721	<i>ycjX</i>	Hypothetisches Protein YcjX	K	
9	ECN1386	<i>yfhG</i>	Putatives alpha-Helixprotein	K	6
10	ECN3110		Hypothetisches Protein	D	5
	ECN3111		Hypothetisches Protein	D	
11	ECN3745	<i>aefA</i>	Kalium-Efflux-system/mechanosensibler Ionenkanal	K	5
	ECN3746	<i>acrR</i>	<i>acrAB</i> Operonrepressor	K	
12	ECN4406	<i>fimG</i>	FimG Proteinpräkursor	D	5
	ECN4407		Hypothetisches Protein	D	
	ECN4408	<i>fimF</i>	Untereinheit der Typ 1 Fimbrien	D	
13	ECN4470		Konserviertes hypothetisches Protein	D	4
14	ECN3950	<i>yafL</i>	Putatives sezerniertes Protein	K	4
	ECN3951		Hypothetisches Protein	D	
	ECN3952	<i>yafK</i>	Putatives sezerniertes Protein	K	
15	ECN0895		Konserviertes hypothetisches Protein	D	3
	ECN0896		Putativer Transkriptionsregulator	S	
16	ECN1034		Hypothetisches Protein	D	3
	ECN1035		Hypothetisches Protein	D	
	ECN1036	<i>gcvT</i>	Aminomethyltransferase	D	
17	ECN2173	<i>fliA</i>	Flagellenbiosyntheseprotein	K	3
18	ECN0280	<i>nikD</i>	Nickeltransport-ATP-bindendes Protein	K	2
	ECN0281	<i>nikC</i>	Nickeltransportsyste-Permeaseprotein	K	
19	ECN0932		Transposase InsN	D	2
	ECN0933		Transposase IS911	D	
20	ECN1194	<i>ygcP</i>	Putativees Antiterminator regulatorisches Protein	K	2
	ECN1195	<i>ygcD</i>	Ferredoxin-ähnliches Protein	D	

21	ECN1296	<i>nrdE</i>	Ribonukleosiddiphosphatreduktase-2-alpha-Protein	K	2
	ECN1297	<i>nrdI</i>	Flavodoxin-ähnliches Protein	K	
	ECN1298	<i>nrdH</i>	Glutaredoxin-ähnliches Protein	D	
22	ECN1586	<i>yfcN</i>	Hypothetisches Protein	D	2
	ECN1587	<i>yfcB</i>	Putatives Adenin-spezifische Methylase	K	
23	ECN2969		Putative Phagentransposase/-integrase	D	2
	ECN2970		phageintegrase (fragment)	D	
24	ECN3079		Hypothetisches Protein	D	2
	ECN3080	<i>csgD</i>	DNA-bindender Transkriptionsaktivator	K	
	ECN3081	<i>csgE</i>	Curli-Produktion Assemblierung/Transport	K	
	ECN3082	<i>csgF</i>	Curli-Produktion Assemblierung/Transport	K	
25	ECN3640	<i>ybdL</i>	Putative Aminotransferase	K	2
	ECN3641	<i>ybdH</i>	Putative Eisen-enthaltende Oxidoreduktase	K	
26	ECN3814	<i>brnQ</i>	Aminosäuretransportsystem II Carrier Protein	K	2
	ECN3815		Hypothetisches Protein	D	
	ECN3816	<i>phoR</i>	Phosphatregulon 2-Komponenten-Sensorhistidinkinase	K	
27	ECN3907		2,5-diketo-D-Glukonsäurereduktase A	D	2
	ECN3908	<i>ykgA</i>	Hypothetischer Transkriptionsregulator YkgA	K	
28	ECN4130	<i>yadS</i>	Putatives Membranprotein	K	2
	ECN4131		Hypothetisches Protein	D	
	ECN4132	<i>yadR</i>	Fe-S-Cluster accessorisches Assemblierungsprotein	K	
29	ECN4446		Putative Transposase	D	2
	ECN4447		Hypothetisches Protein	S	
30	ECN4486		Hypothetisches Protein	D	2
	ECN4487		Hypothetisches Protein	D	
	ECN4488		Putative Transposase	D	
	ECN4489		Transposase	S	
	ECN4490	<i>insI</i>	Transposase für das IS-Element IS30B/C/D	S	
31	ECN5019	<i>ubiB</i>	2-Oktaprenylphenolhydroxylase	D	2
	ECN5020	<i>yigP</i>	Konserviertes hypothetisches Protein	K	
32	ECN5131		Transposase	D	2

S: Stammspezifisches Gen

D: Gen ist in mindestens einem weiteren Stamm vorhanden

K: Kerngenom

Tabelle 4. 10 Intestinal *in vivo* regulierte Gene der Promotorbank von EcN in gnotobiotischen Mäusen

#	Locus tag	Gen	Beschreibung	Kategorie	Anzahl
1	ECN2505	<i>malX</i>	Phosphotransferasesystem	D	>2000
	ECN2506	<i>malI</i>	Maltoseregulon regulatorisches Protein	K	
2	ECN2256	<i>edd</i>	Phosphoglukonatdehydratase	K	20
3	ECN0955		Putative Transposase	D	11
	ECN0956	<i>papI</i>	Regulatorisches Protein des Operons der großen Pilus-Untereinheit	D	
	ECN0957		Hypothetisches Protein der Fimbrienprotein- Familie	S	
4	ECN3950	<i>yafL</i>	Putatives sezerniertes Protein	K	10
	ECN3951		Hypothetisches Protein	D	
	ECN3952	<i>yafK</i>	Putatives sezerniertes Protein	K	
5	ECN3306	<i>aspC</i>	Aspartataminotransferase	K	8
6	ECN3139	<i>papB</i>	F1C und S Fimbrienschalter regulatorisches Protein	D	6
	ECN3140		Putatives Fimbrien-regulatorisches Protein	D	
	ECN3141		Hypothetisches Protein	S	
7	ECN3702	<i>ybbY</i>	Putativer Uracil/ Xanthin-Transporter	D	5
8	ECN1548	<i>dgg</i>	Putatives Hitzeschock DGG Protein	K	4
	ECN1549	<i>yfdY</i>	Hypothetisches Protein	D	
9	ECN3927		Hypothetisches Protein	D	3
	ECN3928		Verkürztes <i>insB</i>	D	
10	ECN3976		Hypothetisches Protein	S	2
	ECN3977		Putative Transposase	D	

S: Stammspezifisches Gen

D: Gen ist in mindestens einem weiteren Stamm vorhanden

K: Kerngenom

4.3.4 Analyse intestinal *in vivo* aktiver Promotoren mit Feature Scan

Feature Scan (Deyneko et al., 2005) ist ein Programm, das durch Vergleich von physikochemischen Eigenschaften wie der Schmelzenthalpie Ähnlichkeiten in DNA-Sequenzen findet. Die Analyse der Promotoren aus den Versuchen mit konventionellen Mäusen (Tabelle 4. 9) mit Feature Scan in Bezug auf die Schmelzenthalpie resultiert in einer Liste kurzer Sequenzen, aus denen aufgrund der Ähnlichkeiten in der Sequenz zwei Motive erstellt werden können (Abbildung 4. 21). Die relative Häufigkeit der einzelnen Nukleotide ist für jede Position des Motivs dargestellt.

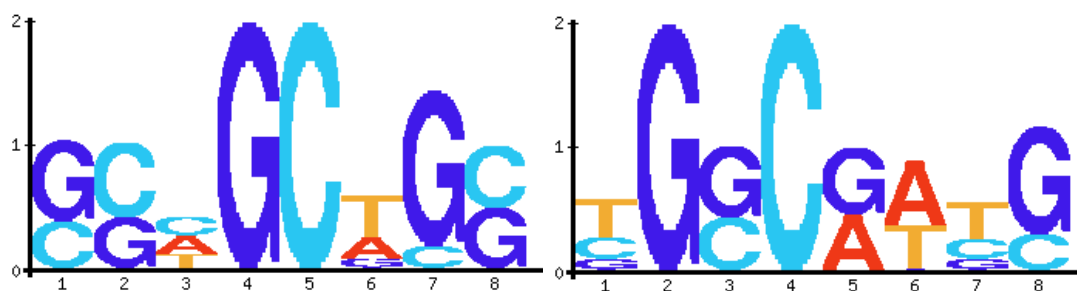


Abbildung 4. 21 Sequenzmotive aus intestinal *in vivo* regulierten EcN-Promotoren

Die Diagramme zeigen zwei Motive der in konventionellen Mäusen intestinal *in vivo* aktiven EcN-Promotoren. Durch Analyse der Promotorsequenzen mit dem Programm Feature Scan sind aufgrund ihrer ähnlichen Schmelzenthalpie Promotormotive gefunden worden, aus denen die dargestellten Motive ermittelt werden. Dargestellt ist die relative Frequenz der einzelnen Nukleotide für die Position im Sequenzmotiv.

Diese Sequenzmotive können mit geeigneten Programmen zur Identifizierung und weiteren Untersuchung von Promotoren mit intestinaler *in vivo*-Aktivität in EcN und anderen probiotischen *E. coli* herangezogen werden. Ein Vergleich der Motive mit Promotoren anderer probiotischer Bakterien kann weitere Hinweise bezüglich ihrer Genregulation im lebenden Organismus bringen.

4.3.5 Entwicklung eines Promotor-Reportergen-Assays

Zur weiteren Untersuchung der intestinal *in vivo* aktiven Promotoren von EcN aus den Tierversuchen (4.3.3) wird ein Reportergen-Assay aufgebaut. Grundlage hierfür ist das *lux*-Operon aus *Photobacterium luminescens* mit den Genen *luxCDABE*, die sowohl das Enzym Luciferase als auch dessen Substrat kodieren (3.8). Der Assay dient dazu, Promotoren *in vitro* auf ihre Funktionalität und Stärke zu testen. Diese Promotoren wie auch Promotoren, die nur *in vivo* aktiv sind, können im Mausmodell mit einem *In Vivo* Imaging System (IVIS 200, Xenogen corporation, Alameda, Kalifornien, USA) näher charakterisiert werden. Um die teilweise recht kurzen Promotoren direkt vor das *lux*-Operon setzen zu können, wird eine entsprechende Klonierungsstrategie mit Promotor-Fusionsprodukten entwickelt und angewendet.

4.3.5.1 Klonierungsstrategie für Promotor-Reporterkonstrukte

Zunächst wird das *lux*-Operon aus dem Plasmid pSB417 (2.6) als 5,8 kb-Fragment über einen Verdau mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* in pUC19 ligiert, wodurch das *lux*-Operon unter der Kontrolle des *lacZ*-Promotors steht. Der als pDS15 bezeichnete Vektor wird als stark leuchtende Positivkontrolle verwendet.

Da das Plasmid pMW82 keinen Promotor vor dem Gen *gfp-ova* besitzt und zudem für Tierexperimente den gleichen Plasmidhintergrund wie bei den Promotorbankversuchen (4.3.1) bietet, soll pMW82 die Grundlage für weitere Promotorkonstrukte werden. Die Klonierungsstrategie ist in

Abbildung 4. 22 schematisch dargestellt. Zur Generierung der Promotorkonstrukte wird das *lux*-Fragment durch Restriktionsverdau mit *PstI* aus pDS15 isoliert und mit *BamHI* nachverdaut. Aus dem Restriktionsverdau von pMW82 mit den gleichen Enzymen resultierte ein 4,3 kb-Fragment ohne *gfp-ova*. Die Ligation des *lux*-Operons über *PstI* und *BamHI* ergibt das Plasmid pDS17, ein promotorloses Konstrukt, das als Negativkontrolle verwendet wird.

Für die Klonierung verschiedener Promotoren vor das *lux*-Operon wird der Vektor pDS18 generiert. Dazu wird das *luxDABE'*, das durch Verdau mit *XbaI* aus dem *PstI*-*lux*-Fragment gewonnen wird, anstelle des *gfp-ova* in pMW82 inseriert. Der gewünschte Promotorbereich wird dann aus genomischer DNA von EcN mit den Primern Px_F und Px-*luxC* amplifiziert, und *luxCD'* wird mit pDS17 als Matrix mit den Primern *luxC*-Px und *luxD* bzw. *luxDneu* amplifiziert. Das x in der Primerbezeichnung steht für die Nummer des Promotorkonstrukts 1-5. Mittels Fusions-PCR (3.3.2) werden diese PCR-Produkte fusioniert, so dass ein mindestens 2 kb großes Fragment über *SalI* und die in *luxD* natürlich vorkommende Schnittstelle *XbaI* in pDS18 ligiert werden kann.

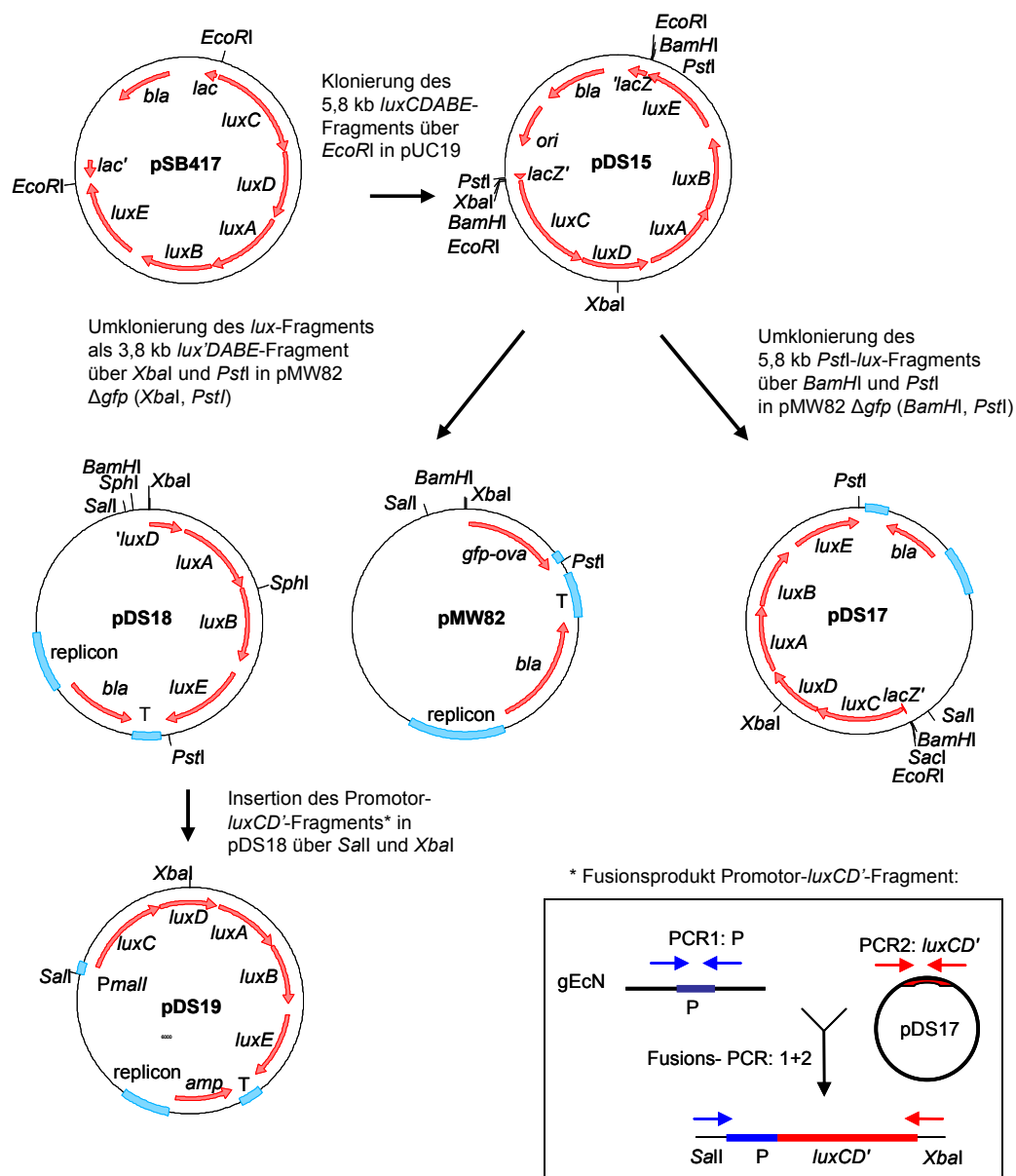


Abbildung 4. 22 Klonierungsstrategie zur Generierung von Promotor-*lux*-Konstrukten

Das Plasmid pSB417 enthält das *lux*-Operon. Durch Umklonierung in pUC19 entsteht pDS15 mit *lacZ*-Promotor. Die Insertion des *lux*-Fragments in pMW82 anstelle des *gfp-ova* ergibt pDS17, ein promotorloses Konstrukt. Das verkürzte *lux'DABE*-Fragment in pMW82 bildet pDS18. Dieses Plasmid dient als Ausgangsvektor für die Promotorkonstrukte. In diesen werden Fusionsprodukte aus dem gewünschten Promotor und *luxCD'* (siehe Kasten) über die natürliche Schnittstelle in *luxD* inseriert und das *lux*-Operon vervollständigt. gEcN: genomische DNA von EcN; P: Promotor; *luxCDABE*: Operon des Luciferin-Luciferase-Systems.

Mit dieser Klonierungsstrategie (Abbildung 4. 22) werden acht verschiedene Promotorkonstrukte (pDS19-pDS26) erstellt, die in Tabelle 4. 11 aufgelistet sind, und durch Sequenzierung mit den Primern pMW82-5, PxF, PxR, luxD und luxD' (8.2) überprüft. Für die Promotorkonstrukte pDS19 und 20 wird auf der Grundlage der Promotorvorhersagen für *E. coli* MG1655 (www.ecocyc.org) ein ca. 200 bp großes Fragment aus den sequenzierten Promotorbereichen (Tabelle 4. 9 und Tabelle 4. 10) gewählt. Als Positivkontrolle wird aus genomischer DNA von EcN der konstitutive Promotor von *gyrB*, das die Untereinheit B der DNA-Gyrase kodiert, hergestellt (pDS21). Die Promotoren P4 und P5 entsprechen in ihrer Größe den sequenzierten Promotorregionen aus den Promotorbank-Experimenten (4.3.3) und bilden als Promotoren des *lux*-Operons die Plasmide pDS22 (P4) und pDS25 bzw. pDS26 (P5). Der Promotor P4 wird zusätzlich in zwei Abschnitte geteilt, P4a und P4b, um Hinweise auf die Lage des eigentlichen Promotors und des korrespondierenden Gens zu bekommen. P4a ist der Bereich stromaufwärts von *selD* (pDS23), während die P4b-Sequenz in *selD* liegt und möglicherweise die Transkription des folgenden Gens *topB*, einer DNA-Topoisomerase, reguliert. P4b ist Bestandteil des Plasmids pDS24. pDS25 enthält einen Basenaustausch in der Promotorregion. pDS26 enthält die korrekte Sequenz der Promotorregion. pDS25 wird verwendet, um den möglichen Einfluss einer Punktmutation im Promotor im Vergleich zu pDS26 zu zeigen. Die Promotorkonstrukte pDS17 und pDS19 bis pDS26 werden in EcN transformiert, um stammspezifische Regulationen der Promotoren zu gewährleisten. Die jeweilige Expression der Luciferin-Luciferase-Komponenten wird in Form von Biolumineszenz im BioImager (LAS 3000, Fujifilm Europe, Düsseldorf) gemessen (4.3.5.2).

Tabelle 4. 11 Promotorkonstrukte und Kontrollplasmide

Plasmid	Promotor	Korrespondierendes Gen (Locus tag)	Verwendete Primer	Bemerkung
pDS15	<i>P_{lacZ}</i>	<i>lacZ</i> aus pUC19	–	Positivkontrolle
pDS17	–	–	–	Promotorloses Konstrukt, Negativkontrolle
pDS18	–	–	–	Klonierungsvektor für Promotorkonstrukte
pDS19	P2	<i>malI</i> (ECN2506)	P2R, P2F, P2- luxC, luxD'	Promotorbank EcN, ca. 170 bp zwischen <i>malX</i> und <i>malI</i>
pDS20	P3	<i>malX</i> (ECN2505)	P3F, P3R, P3- luxC, luxD'	Promotorbank EcN, ca. 170 bp zwischen <i>malI</i> und <i>malX</i> (Basenaustausch im Promotor)
pDS21	P1	<i>gyrB</i> (ECN0004)	P1F, P1R, P1- luxC, luxD'	Positivkontrolle
pDS22	P4	<i>selD</i> (ECN2349) komplett	P4F, P4R, P4- luxC, luxD'	Promotorbank EcN, ca. 600 bp im Bereich von <i>selD</i>
pDS23	P4a	<i>selD</i> (ECN2349)	P4F, P4Ra, P4- luxCa, luxDneu	Teil1 von P4, ca. 320 bp vor <i>selD</i>
pDS24	P4b	<i>topB</i> (ECN2350)	P4Fb, P4R, P4- luxC, luxDneu	Teil 2 von P4, ca. 290 bp in <i>selD</i>
pDS25	P5	Hypothetisches Protein (ECN3895)	P5F, P5R, P5- luxC, luxDneu	Promotorbank EcN, ca.630 bp in EcN3894 und ECN3895, Basenaustausch im Promotor
pDS26	P5	Hypothetisches Protein (ECN3895)	P5F, P5R, P5- luxC, luxDneu	Promotorbank EcN, ca.630 bp in EcN3894 und ECN3895, fehlerfreies Konstrukt

4.3.5.2 Etablierung des Promotor-Reportergen-Assays *in vitro*

Die auf LB/Amp-Agar ausgestrichenen Stämme EcN pDS15, 17 und 19-25, werden nach Inkubation über Nacht bei 37°C im BioImager auf Biolumineszenz überprüft. Dabei zeigt sich, dass bis auf EcN pDS24, EcN pDS25 und EcN pDS26 alle übrigen Stämme mit Promotorkonstrukten innerhalb von 24 Stunden Biolumineszenz entwickeln (Abbildung 4. 23). EcN pDS17 enthält keinen Promotor vor dem *lux*-Operon. Bei diesem Stamm ist auch nach 24 Stunden Inkubation auf LB/Amp-Agar keine Biolumineszenz zu detektieren.

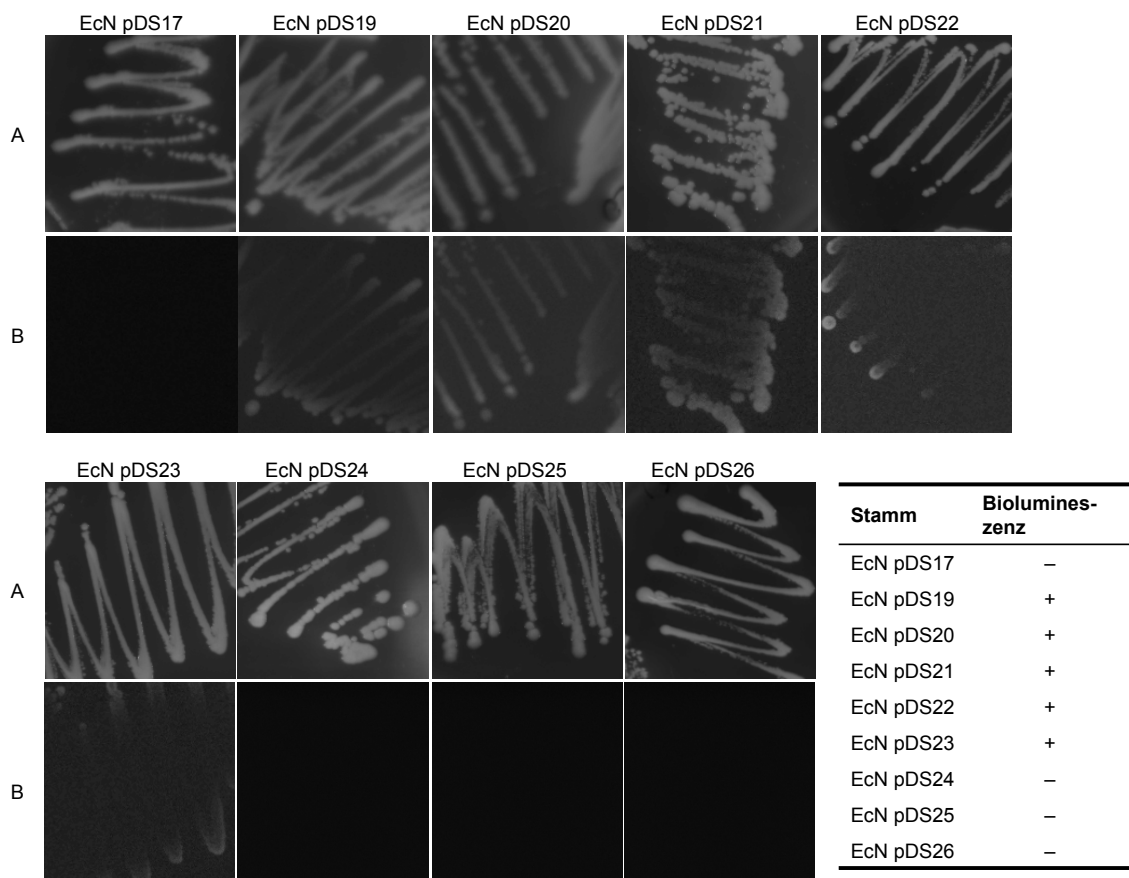


Abbildung 4. 23 Biolumineszenz der *lux*-Reporterkonstrukte in EcN

Dargestellt sind die Stämme EcN pDS17 und EcN pDS19 bis EcN pDS26 nach 24 Stunden Inkubation auf Agarplatten. Die Aufnahmen mit Auflicht (A) und die Biolumineszenz (B) der Kolonien sind jeweils untereinander angeordnet. Die Dokumentation erfolgt mit dem BioImager LAS 3000 (Fujifilm Europe, Düsseldorf). Die Ergebnisse der Biolumineszenz *in vitro* sind tabellarisch zusammengefasst.
+ Biolumineszenz; - keine Biolumineszenz detektierbar.

Die Beobachtung der Lumineszenzentwicklung während der Kultivierung soll Aufschluss über die Stärke der einzelnen Promotoren und die Abhängigkeit von der Wachstumsphase geben. Zunächst wird in einem Vorversuch mit EcN pDS15 und EcN pDS19 die Biolumineszenzentwicklung im zeitlichen Verlauf bei zunehmender Zelldichte in LB-Medium und MOPS-Minimalmedium getestet.

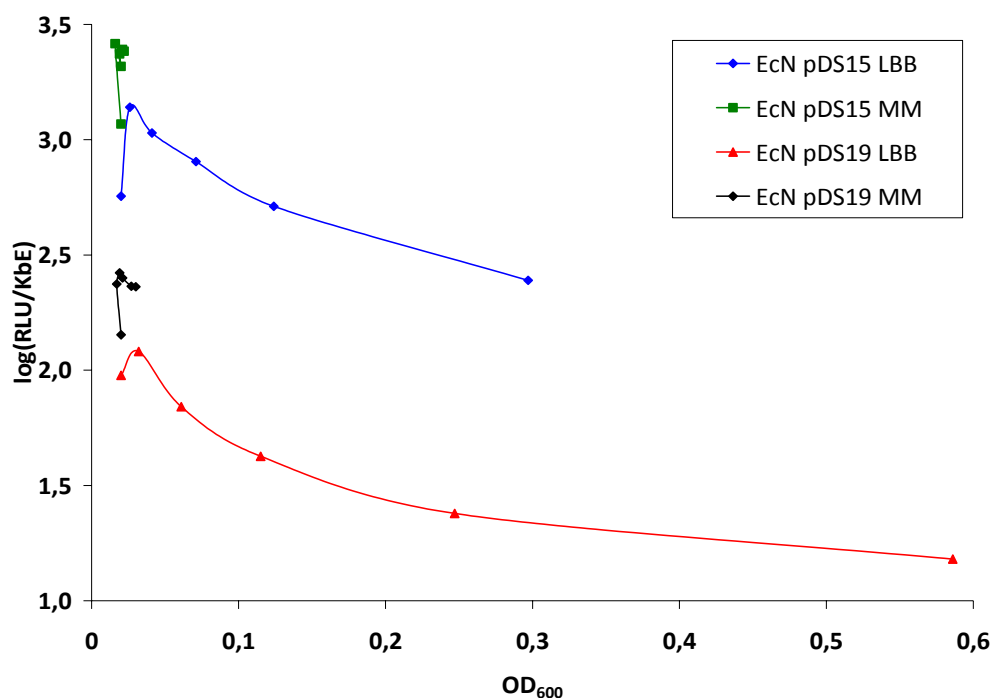


Abbildung 4. 24 Biolumineszenz von EcN pDS15 und EcN pDS19 in LB-Medium und MM-Medium

Dargestellt ist die Abhängigkeit der Biolumineszenz pro Bakterium als $\log(\text{RLU/KbE})$ zur Wachstumsphase, angegeben als optische Dichte OD_{600} , in LB-Medium (LBB) und MOPS-Minimalmedium (MM). Der Zeitraum der Messung beträgt 100 min. RLU: Relative Lichteinheiten.

Wie in Abbildung 4. 24 grafisch dargestellt ist, ist die Lumineszenz von EcN pDS15 stärker als die Lumineszenz von EcN pDS19, was vermutlich auf die unterschiedliche Kopienzahl der Konstrukte zurückzuführen ist (Yanisch-Perron et al., 1985; Bolivar et al., 1977). Zudem sind in beiden Konstrukten unterschiedliche Promotoren enthalten (Tabelle 4. 11). Bei beiden Stämmen ist die Biolumineszenz in MOPS-Minimalmedium stärker als in LB-Medium. In beiden Medien ist für beide Stämme jedoch ein schneller Anstieg zu sehen gefolgt von einer langsamen Abnahme der Biolumineszenz. Die Veränderungen der Biolumineszenz im Verlauf des Bakterienwachstums sind in LB-Medium aufgrund des schnelleren Wachstums jedoch besser zu beobachten. Deshalb werden die folgenden Versuche in LB-Medium durchgeführt.

Pro Stamm werden 50 ml LB/Amp in einem 250 ml-Erlenmeyerkolben vorgelegt, um ein ausreichend großes Kulturvolumen für die Dauer des Versuchs zur Verfügung zu haben, und aus einer Vorkultur angeimpft. Die optische Dichte zu Beginn jedes Versuchs wird auf $\text{OD}_{600} = 0,02$ eingestellt, damit vergleichbare Wachstumskurven für

jeden zu testenden Stamm entstehen. Die optische Dichte (OD_{600}) und die Lichtemission der Kulturen werden alle 30 min photometrisch und mit dem BioImager dokumentiert. Dadurch kann die Biolumineszenz in verschiedenen Wachstumsphasen der Stämme beobachtet werden.

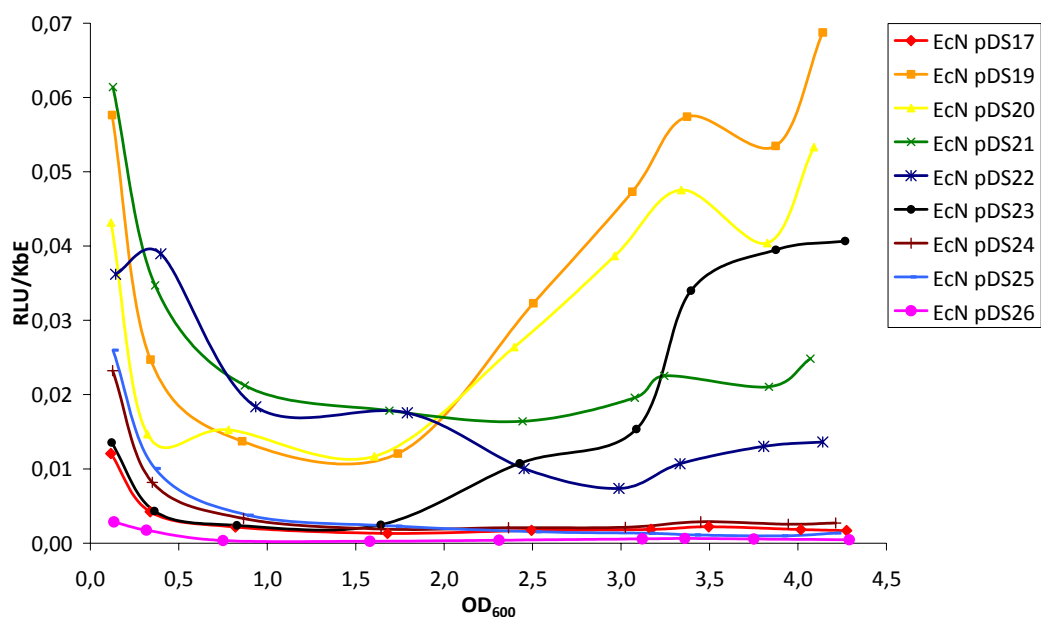


Abbildung 4. 25 Biolumineszenz verschiedener Promotor-Reporter-Konstrukte in EcN

Im Diagramm aufgetragen ist die Biolumineszenz als relative Lichteinheiten pro Bakterium (RLU/KbE) verschiedener Promotor-Reporter-Konstrukte in EcN gegen die Dichte der Bakterienkultur als OD_{600} . Die Daten stammen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Dabei werden in Schüttelkolbenkulturen die Dichte und Biolumineszenz im Verlauf des Wachstums verschiedener Promotor-Reporter-Konstrukte in EcN bestimmt. Die Legende ist der Abbildung zu entnehmen. Standardabweichungen sind wegen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Die in Abbildung 4. 25 dargestellten Versuchsergebnisse sind aus mindestens drei unabhängigen Versuchen pro Stamm gemittelt und in relative Lichteinheiten pro Bakterium umgerechnet. Das promotorlose Konstrukt pDS17 in EcN dient als Negativkontrolle. Hier wird aufgrund der sensitiven Methode und der Berechnung eine basale Biolumineszenz detektiert, die im Bereich des Leerwerts (LB-Medium) liegt und als negativ interpretiert wird. Das Konstrukt mit dem konstitutiven Promotor pDS21 in EcN wird als Positivkontrolle mitgeführt. Die Biolumineszenz pro Bakterium bleibt hier über den Zeitraum der Messung annähernd gleich. Die Stämme EcN pDS26, EcN pDS25 und EcN pDS24 zeigen *in vitro* keine Biolumineszenz. Die Stämme EcN pDS19 und EcN pDS20, die den Promotor von *malI* und *malX* mit der gleichen Sequenz,

jedoch invers auf dem Plasmid vor dem *lux*-Operon tragen, sind in der Entwicklung der Biolumineszenz in Abhängigkeit zur Wachstumsphase sehr ähnlich. Erst in der stationären Wachstumsphase ist bei EcN pDS19 (*malI*-Promotor) die Biolumineszenz stärker als bei EcN pDS20 (*malX*-Promotor). Im Gegensatz zur Positivkontrolle EcN pDS21 steigt in beiden Stämmen die Biolumineszenz in der stationären Wachstumsphase an. EcN pDS22 mit dem kompletten *selD*-Promotorfragment (vgl. Tabelle 4. 11) zeigte einen Abfall der Kurve, der sich in der stationären Wachstumsphase nach einer mit EcN pDS21 vergleichbaren Biolumineszenz zu Beginn der Kultivierung fortsetzt. Bei EcN pDS23 kann erst bei einer optischen Dichte ab etwa $OD_{600} = 1,5$ Biolumineszenz nachgewiesen werden, die im Verlauf der Kultivierung weiter ansteigt.

Die verschiedenen Promotorkonstrukte lassen sich aufgrund der Biolumineszenzmuster voneinander unterscheiden, die Orientierung der *malI*- und *malX*-Promotoren hat kaum einen Einfluss auf die Stärke der Biolumineszenz und damit auf die Expression nachgeschalteter Proteine. Der Promotor aus pDS22, der das komplette *selD*-Fragment enthält, ist eher in der exponentiellen Wachstumsphase aktiv. Das in pDS23 enthaltene Fragment der Promotorsequenz *selD* ist dagegen erst ab der späten exponentiellen Wachstumsphase aktiv. Das Fragment in pDS24 enthält entweder keinen Promotor oder einen ausschließlich intestinal *in vivo* aktiven Promotor. Die Genregulation durch die Promotoren scheint hier zumindest teilweise in einem Bereich zu liegen, der durch die Zerteilung des Promotorfragments P4 (pDS22) in P4a (pDS23) und P4b (pDS24) zerstört oder verändert wurde. Es ist nicht auszuschließen, dass eine Regulation *in vivo* zu einem anderen Ergebnis der Expression des *lux*-Operons führt. Die Konstrukte pDS25 und pDS26 tragen wahrscheinlich einen intestinal *in vivo* aktiven Promotor. Der Einfluss der Punktmutation im Promotorbereich von pDS25 bleibt unklar und kann in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Der Reporterassay eignet sich zur Untersuchung von Promotoren auf ihre Funktionalität und Stärke sowie der von der Wachstumsphase abhängigen Aktivität *in vitro*. Die Stämme EcN pDS22 bis EcN pDS26 sollen zur näheren Charakterisierung ihrer intestinalen *in vivo*-Aktivität im Mausmodell näher untersucht werden.

4.3.5.3 Aufbau des Promotor-Reportergen-Assays im Mausmodell

Zur Untersuchung der Aktivität der Promotor-Konstrukte *in vivo* werden EcN pDS15 und EcN pDS21 als Positivkontrollen im Mausmodell getestet. Um eine Biolumineszenz durch EcN oder durch die Mäuse auszuschließen, dient EcN Wildtyp als Negativkontrolle. Im ersten Tierversuch wird die Biolumineszenz von EcN und EcN pDS15 in konventionellen Balb/c-Mäusen getestet (Abbildung 4. 1 A und B). Die Detektion erfolgt 6 bzw. 24 Stunden nach Inokulation mit dem *In Vivo* Imaging System IVIS 200 (Xenogen Corporation, Alameda, CA, USA). Die Mäuse werden jeweils für den Zeitraum der Messung anästhesiert. Da das Luciferin-Luciferase-System sauerstoffabhängig ist, können Experimente dieser Art nur an lebenden Tieren durchgeführt werden, wie bereits von Wiles et al. (Wiles et al., 2006) gezeigt wurde. Die erste Messung nach 6 Stunden führt nach 1 min Exposition zu sichtbarer Biolumineszenz im Darmbereich der Mäuse mit EcN pDS15. Die zweite Messung, die etwa 24 Stunden nach Inokulation durchgeführt wird, zeigt erst nach 5 min Exposition eine schwache Biolumineszenz. Die Därme (jeweils Zäkum und Kolon) werden nach Tötung der Mäuse präpariert (Abbildung 4. 26 C). Zur Detektion der Biolumineszenz ist es notwendig, das Zäkum jedes Mäusedarms zu eröffnen, da die Sauerstoffversorgung im Darm ohne Blutzufuhr für die Aktivierung des Luciferin-Luciferase-Systems zu gering ist. Im Zäkum ist 6 Stunden nach Inokulation starke Biolumineszenz zu messen; nach 24 Stunden kann keine Lumineszenz mehr detektiert werden. Mäuse, die nur EcN Wildtyp erhalten haben, zeigen keine Biolumineszenz.

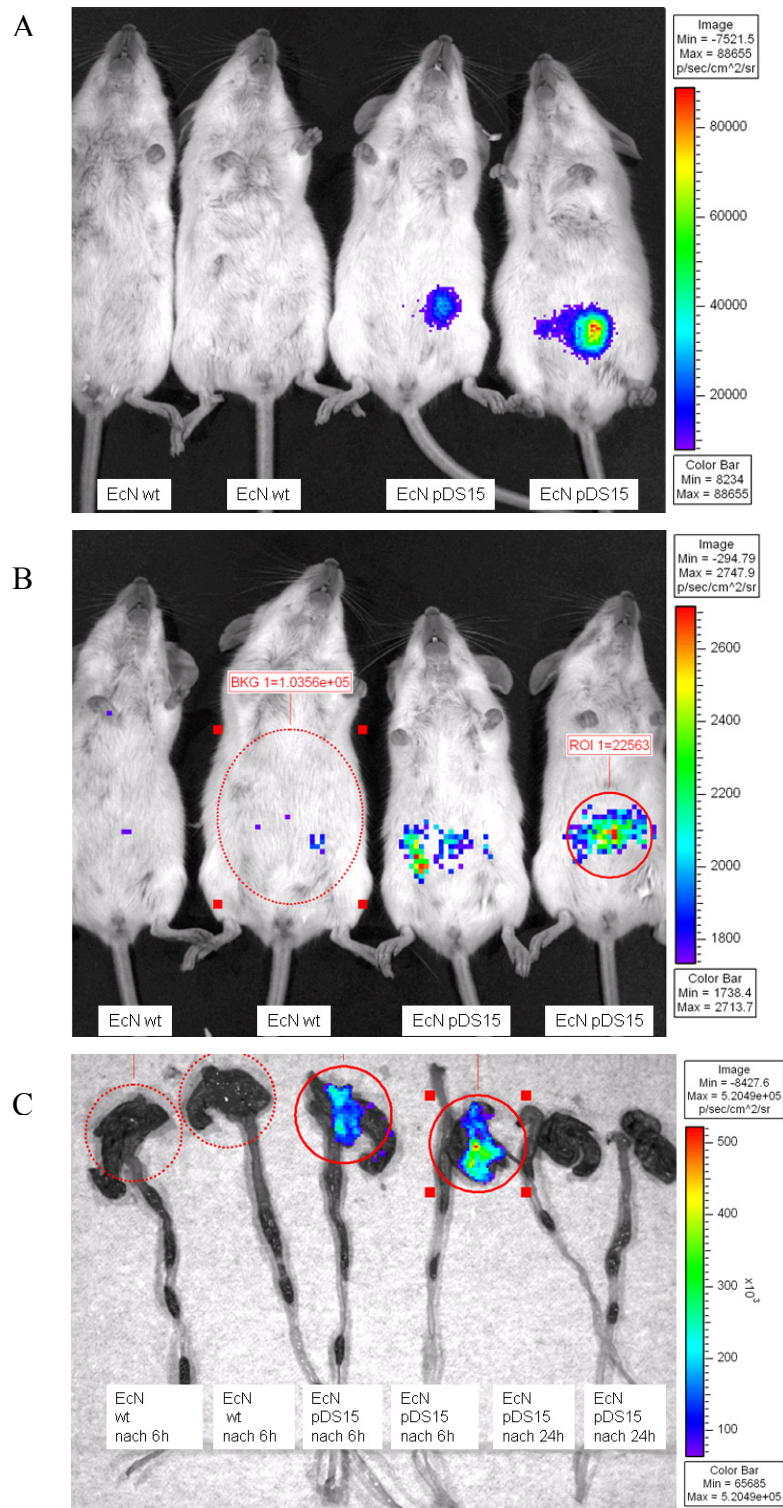


Abbildung 4. 26 *In vivo* Biolumineszenz von EcN pDS15 in Balb/c-Mäusen

Balb/c-Mäusen wird mittels Gavage EcN oder EcN pDS15 appliziert. Nach 6h (A) und 24h (B) wird die Biolumineszenz an anästhesierten Mäusen gemessen (IVIS 200, Xenogen Corporation, Alameda, CA, USA). Die Überlagerung von Foto und Biolumineszenz ermöglicht die Lokalisierung der EcN pDS15 im Darm der Mäuse. Anhand der Skala am rechten Bildrand wird die Intensität der Biolumineszenz bestimmt. Zäkum und Kolon (C) sind zur Detektion eröffnet worden.

In einem zweiten Versuch (Abbildung 4. 27) kann gezeigt werden, dass die Biolumineszenz von pDS21 mit niedriger Kopeinzahl in EcN in Balb/c-Mäusen genau so gut detektiert werden kann wie im vorangegangenen Versuch mit EcN pDS15, bei dem das Plasmid in hoher Kopeinzahl vorliegt. Damit können auch die übrigen Promotorkonstrukte (Tabelle 4. 11) in diesem Modell getestet werden. Da bei den Mäusen mit EcN pDS15 nach 24 Stunden keine Biolumineszenz mehr detektierbar ist, wie im ersten Versuch festgestellt werden musste, werden die Abstände zwischen Inokulation und Messung verkürzt.

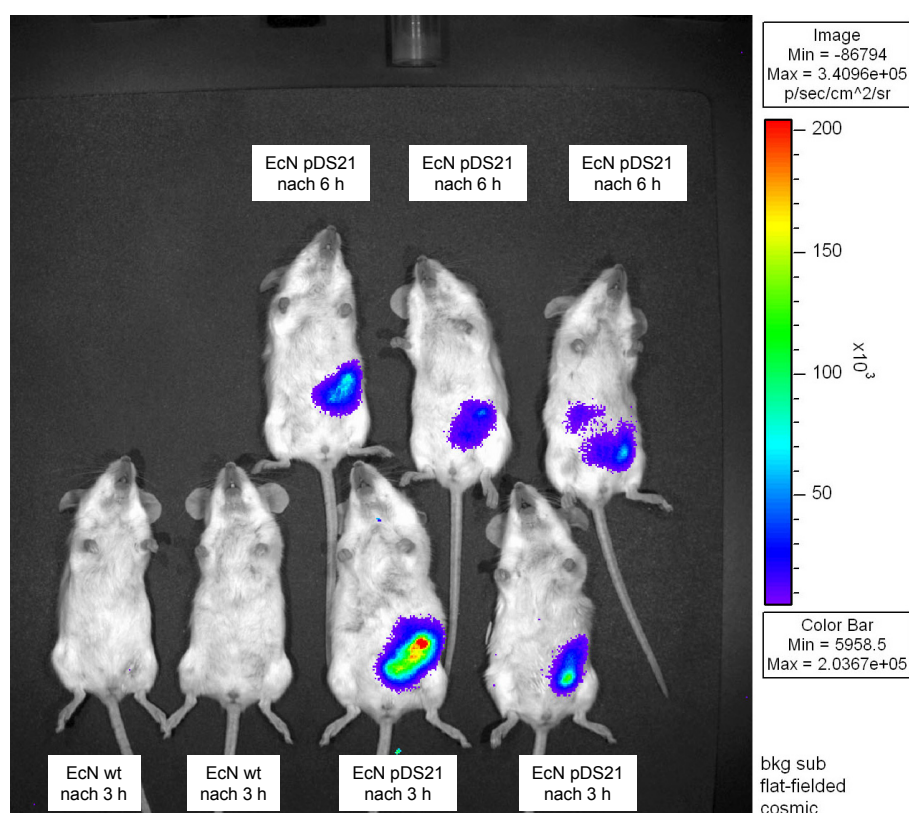


Abbildung 4. 27 *In vivo* Biolumineszenz von EcN pDS21 in Balb/c-Mäusen

Nach Inokulation von EcN pDS21 oder EcN Wildtyp in Balb/c-Mäuse wird im Abstand von 3 und 6 Stunden mittels IVIS (Xenogen Corporation, Alameda, CA, USA) die Biolumineszenz gemessen. Obere Reihe: Balb/c mit EcN pDS21 sechs Stunden nach Inokulation. Untere Reihe, links: zwei Balb/c mit EcN, rechts: zwei Balb/c mit EcN pDS21, jeweils drei Stunden nach Inokulation. Die Skala am rechten Bildrand gibt die Intensität der Biolumineszenz wieder. EcN pDS21 sind im Darm der Mäuse lokalisiert.

Insgesamt ist der Versuchsaufbau geeignet, die Aktivität ausgewählter Promotoren *in vivo* in der Maus zu untersuchen. Die zeitlichen Abstände der Messungen müssen durch weitere Versuche genauer festgelegt werden, um die Beobachtung von EcN und die Aktivität der plasmidkodierten Promotoren während der Darmpassage zu optimieren.

5 Diskussion

Schon vor etwa 100 Jahren, in der präantibiotischen Ära, wurde der probiotische Stamm EcN zur Behandlung verschiedener Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes eingesetzt (Nissle, 1918). Mit der Entdeckung antibakterieller Chemotherapeutika geriet das Bakterium jedoch in Vergessenheit. Erst durch erfolgversprechende klinische Studien mit der Verwendung von EcN zur Remissionserhaltung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Kruis et al., 1997; Kruis et al., 2004; Rembacken et al., 1999) gelangte der Stamm wieder in den Fokus der Aufmerksamkeit.

EcN gehört derzeit zu den am besten untersuchten Probiotika und wird zunehmend als Referenzstamm eingesetzt (Sonnenborn et al., 2008). In den letzten 20 Jahren konnten einige Wirkmechanismen aufgedeckt werden, so dass der probiotische Effekt von EcN auf eine Interaktion von Strukturkomponenten und stammspezifischen Synthesleistungen des Stamms mit den Zellen des Darms zurückgeführt wird. Trotz intensiver Forschung sind die molekularen Mechanismen der probiotischen Eigenschaften des Stamms unklar. Um weitere Erkenntnisse bezüglich der probiotischen Wirkung zu gewinnen, wird in dieser Arbeit das Genom des probiotischen Stamms EcN analysiert und auf intestinal *in vivo* regulierte Gene untersucht. Der uropathogene *E. coli* CFT073 wird aufgrund des ähnlichen Genotyps als Kontroll- und Vergleichsstamm herangezogen, obwohl er im Gegensatz zu EcN einen virulenten Phänotyp besitzt und ein Erreger von Harnwegsinfekten und Sepsis ist.

5.1 EcN: Genomanalyse und Probiotik

Bakterien repräsentieren die wohl älteste Lebensform auf der Erde. Ihr enormes evolutionäres Potenzial zeigt sich durch die verschiedenen Eigenschaften bezüglich ihres Stoffwechsels, der Zellstruktur sowie ihrer Lebensweise und Wirtsspezifität. Auch in einer taxonomischen Gruppe wie den Darmbakterien gibt es innerhalb einer Spezies eine hohe Diversität. Diese beruht auf der genetischen Variabilität und entsteht durch Punktmutationen und Rekombinationsereignisse, die zu Modifikationen und zur Inaktivierung von Genen führen, sowie durch Insertionen und Deletionen von DNA-

Fragmenten (Ochman und Jones, 2000; Hacker und Carniel, 2001; Dobrindt und Reidl, 2000). Der Einfluss von Bakterienstämmen auf die Gesundheit ihres Wirts ist deshalb vielfältig. Besonders für humanpathogene *E. coli*, die mit Erkrankungen wie Enteritis, Harnwegsinfektionen oder Neugeborenenmeningitis assoziiert sind (Tabelle 1. 1), wurden bemerkenswert unterschiedliche Genotypen nachgewiesen (Kaper et al., 2004) und verschiedene Virulenzfaktoren als Ursache bestimmter Krankheitssymptome beschrieben. Neben der Erforschung von Pathogenitätsmechanismen wuchs in den letzten zwei Jahrzehnten vor allem das Interesse an Organismen wie EcN, die einen positiven und gesundheitsfördernden Einfluss auf ihren Wirt ausüben. EcN gilt als sicherer Organismus, der Stamm ist aber gleichzeitig den uropathogenen Stämmen sehr ähnlich. Die molekulare Analyse des EcN-Genoms bringt wertvolle Einblicke in die Genomorganisation und zeigt, dass die Einordnung als harmloser und apathogener Kommensale unter den verschiedenen *E. coli*-Phänotypen fraglich ist.

5.1.1 Die Struktur des EcN-Genoms

Das Genom von EcN ist in Bezug auf Größe, GC-Gehalt und Anzahl der Gene vergleichbar mit bisher publizierten *E. coli*-Genomen (Tabelle 4. 1). Unterschiede in der Sequenzlänge sind vor allem auf horizontal erworbene DNA der genomischen Inseln, Prophagen sowie kleinere Insertionen und Deletionen zurückzuführen. Die Anzahl der in diesen Genomsequenzen identifizierten Gene variiert teilweise stark. *E. coli* UTI89, der in Bezug auf die Genomlänge und Anzahl der Gene dem EcN Genom ähnlich ist, kodiert in seinem Genom von 5065741bp 5066 Gene, während *E. coli* SMS-3-5 in seinem unwesentlich längeren Genom mit 5068389bp nur 4742 Gene kodiert (Tabelle 4. 1). Diese Unterschiede sind in erster Linie auf die Benutzung einzelner oder mehrerer verschiedener Programme zur Identifizierung und zur automatischen Annotation von CDS zurückzuführen, die in der Identifikation von Genen teilweise unterschiedliche Ergebnisse liefern. Dadurch ist eine genaue Zuordnung der einzelnen Gene in die Kategorien Kerngenom, stammspezifische Gene und in mehreren Stämmen vorkommende Gene, wie sie in für EcN vorgenommen wurde, nur unter Vorbehalt möglich. Durch die Einbeziehung weiterer vollständig sequenzierter und annotierter *E. coli*-Genome werden Verschiebungen innerhalb der Kategorien Kerngenom und flexibler Genpool stattfinden, wie auch die Berechnung anhand der EcN-Gene

(Abbildung 4. 3) zeigt. Die damit verbundene geringfügige Verkleinerung des Kerngenoms führt zur weiteren Annäherung an ein *E. coli*-Minimalgenom, das neben den Grundfunktionen des Wachstums, der Zellteilung und der Stoffwechselvorgänge die für *E. coli* charakteristischen Gene enthält (Feher et al., 2007).

Der horizontale Gentransfer innerhalb einer Spezies oder auch zwischen Genera ermöglicht die Aufnahme von Genen und Genclustern, die zu drastischen Veränderungen im Verhalten der Organismen und damit zur sogenannten „Evolution in Quantensprüngen“ führen kann (Groisman und Ochman, 1996). Der Erwerb solcher Fitness- oder Virulenzfaktoren in Form von genomische Inseln, Pathogenitätsinseln, Prophagen und Transposons kann selektive Vorteile in der Besiedlung von ökologischen Nischen oder in der Konkurrenz um das Überleben sowohl innerhalb der Art als auch gegenüber anderen Stämmen bedeuten. Rekombinationsereignisse auch innerhalb dieser Inseln können weitere Veränderungen hervorrufen. Diese weiterführende Modulation der Genomstruktur kann ebenfalls die Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen verbessern.

Die 12 GI und Prophagen, die in EcN identifiziert wurden (Tabelle 4. 2), zeigen überwiegend die charakteristischen Merkmale des horizontalen Gentransfers (4.1.4). Durch Analyse des gesamten Genoms auf Protein- und Nukleotidebene war es möglich, die bereits veröffentlichten GEI I-IV (Grozdanov et al., 2004) und pks (Nougayrede et al., 2006) zu identifizieren und zu überarbeiten. Zusätzlich konnten neue GIs und Prophagen identifiziert werden. Diese Inseln enthalten viele als Fitness- und Virulenzfaktoren eingestufte Gene wie Autotransporter, Siderophorensysteme, Mikrozine und Fimbrien. Die meisten stammspezifischen Gene von EcN sind auf diesen GIs und Prophagen lokalisiert. Sie sind interessante Zielgene für die weitere Charakterisierung auf der Grundlage des EcN-Genoms. GI_{EcN}I ist zum Beispiel eine bisher völlig unbekannte Insel, die überwiegend hypothetische Proteine kodiert.

Auslöser für die Mobilisierung von GI, PAI und kleineren mobilen Elementen sind z.B. Umwelteinflüsse wie Temperatur und Bakteriendichte, die in Biofilmen eine Rolle spielen und durch Quorum sensing und andere Faktoren die Genregulation beeinflussen. Einige der in dieser Arbeit identifizierten Promotoren, die intestinal *in vivo* aktiv sind, sind mit Transposasen assoziiert. Es ist also wahrscheinlich, dass die Aktivität innerhalb

der mobilen genetischen Elemente von EcN während der Darmpassage zu einer Mobilisierung von DNA-Fragmenten oder ganzer GI führt. Auch der alternative Sigmafaktor RpoS kann in der stationären Wachstumsphase zu einer vermehrten Deletion von GIs und PAIs führen. Parallel zur Mobilisierung ist auch die Stabilisierung von Inseln ein voranschreitender Prozess, wie für *E. coli* 536 gezeigt werden konnte (Middendorf et al., 2004). Ein genetisches Merkmal, das sich als vorteilhaft für den Bakterienstamm herausstellt, ist dem Selektionsdruck bezüglich stabilisierender Mutationen unterworfen. So haben z.B. die HPI (high pathogenicity island) von *Y. enterocolitica* oder die SPI-1 von *S. enterica* jegliche Mobilität verloren (Hacker und Kaper, 2000; Bach et al., 1999; Rakin et al., 1999). Die genetisch variable Region der tRNA *argW* (Abbildung 4. 5) von EcN ist möglicherweise aus einer genomischen Insel entstanden. Die bei EcN fehlenden Transposasen und IS-Elemente sowie die Prophageninsertionen anderer Stämme im Vergleich zu der wahrscheinlich unveränderten Region in *E. coli* HS lassen Vermutungen zu, dass in EcN ein Stabilisierungsprozess stattgefunden hat. In diesem Bereich des EcN-Genoms werden ein Autotransporter unbekannter Funktion und zwei Tyrosin-Rekombinasen (ECN1565 *ipuB* und ECN1566 *ipuA*) kodiert. IpuA ist jedoch in die Kontrolle der Fimbrien-Expression involviert. Es konnte gezeigt werden, dass IpuA ähnlich wie FimB durch Inversion des FimA-Promotors die Expression der Typ1-Fimbrien an- und ausschalten kann (Gally et al., 1993; Schwan et al., 2002; Bryan et al., 2006). Da EcN ein verkürztes *fimB* besitzt und als *fimB*-Null-Stamm beschrieben wird (Stentebjerg-Olesen et al., 1999), ist IpuA wahrscheinlich für die beobachtete Expression der TypI-Fimbrien zuständig. Hierin ist möglicherweise der evolutionäre Vorteil einer GI-Stabilisierung für EcN begründet.

5.1.2 Der Einfluss genomischer Inseln und stammspezifischer Gene auf den probiotischen Phänotyp von EcN

Die meisten der 121 stammspezifischen Gene von EcN sind auf den GI und Prophagen lokalisiert. Die Deletionen einiger GI und Sequenzen einer Länge von 30-95 kb in EcN (4.2.2) sollten die Gruppe stammspezifischer Gene identifizieren, die möglicherweise einen Einfluss auf die probiotischen Eigenschaften von EcN haben. Der von Kleta et al. (Kleta et al., 2006) beschriebene Assay mit den porcinen intestinalen Epithelzellen

(IPEC-J2) und einem für Schweine pathogenen EPEC wurde auf Bedingungen des humanen Intestinaltraktes umgestellt. Dazu wurde die humane intestinale Epithelzelllinie Caco-2 und der humanpathogene EPEC E2348/69 verwendet. Eine Reduktion der Adhärenz von EPEC an die Epithelzellen nach Inkubation mit EcN Wildtyp konnte nachgewiesen werden. Die Testung der Deletionsmutanten EcNDS1 bis ECNDS11 (Tabelle 4. 6) zeigte bei den Mutanten EcNDS1, EcNDS4, EcNDS5, EcNDS8 und EcNDS11 teilweise eine Reversion des Effekts, der bei EcNDS4 weniger stark ausgeprägt war und zu einer mäßigen Adhärenz der EPEC geführt hat. Mit Ausnahme von EcNDS11 ist in all diesen Mutanten die genomische Insel GEI I deletiert. Diese kodiert unter anderem F1C-Fimbrien, Mikroazine, Autotransporter sowie die phagenverwandten und nicht näher charakterisierten Gene *yeeP* und *yeeS-W*. In der Deletionsmutante EcNDS11 ist dagegen nur ein Teil der GEI_{EcN}IX deletiert. Auf dieser Insel liegen die Gene für das Eisendicitratsystem (*fec*) zur Eisenaufnahme und ebenfalls die paralogen Gene *yeeP* und *yeeS-W*. Diese sind jedoch in mehreren Inseln wie der GEI I lokalisiert und daher als Auslöser für den Effekt auszuschließen. Eine verminderte Adhärenz von EcN an Caco-2-Zellen ist durch das Fehlen der F1C-Fimbrien möglich, sodass durch fehlende kurzfristige Interaktion von EcN mit den Epithelzellen die nachfolgende Adhärenz der EPEC nicht reduziert wird. Weitere Faktoren, die zur Verminderung der Adhärenzeffizienz führen und in den Mutanten EcNDS11, EcNDS1, EcNDS4, EcNDS5 und EcNDS8 deletiert sind, sind allein auf Sequenzebene durch die annotierten Gene nicht zu ermitteln. Der beobachtete Effekt bedarf weiterer Klärung und muss z.B. durch Komplementationsexperimente verifiziert werden.

Lösliche Komponenten von EcN sind nicht an der Abnahme der Adhärenzeffizienz von EPEC beteiligt. Der Einfluss von löslichem Flagellin von EcN wurde im Zusammenhang mit der gesteigerten Expression von hBD-2 in Caco-2-Zellen beschrieben (Schlee et al., 2007). hBD-2 ist ein von Epithelzellen exprimiertes antimikrobielles Peptid mit breitem Wirkungsspektrum gegen Bakterien, Pilze und Viren und gilt als Mediator der angeborenen Immunität (Boman, 2003). EcN aktiviert die hBD-2-Expression über die Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-1 (Wehkamp et al., 2004). Es wird vermutet, dass eine Verstärkung der mukosalen Barriere stattfindet, wodurch bakterielle Adhärenz und Invasion vermindert wird (Schlee et al., 2007). In

dem Adhärenzassay konnte nur der direkt vermittelte Einfluss von EcN und einigen Deletionsmutanten auf die Adhärenzeffizienz von EPEC festgestellt werden (4.2.3). Eine dosis- und zeitabhängige Adhärenz von EcN an die humane intestinale Epithelzelllinie Intestine-407 ist bekannt (Boudeau et al., 2003), sodass ein inhibitorischer Effekt durch Adhäsion von EcN möglich ist. Die Adhärenz von EcN an Caco-2-Zellen wurde bisher jedoch nicht beobachtet. Eine Abhängigkeit der Adhärenz vom Zelltyp und entsprechenden Rezeptoren muss in Erwägung gezogen werden. Lösliches Flagellin und die damit verbundene Erhöhung der hBD-2-Expression in Caco-2-Zellen scheint nach der kurzen Inkubationszeit keinen Einfluss auf die Adhärenzeffizienz von EPEC zu haben.

Die Verminderung der Invasivität von *S. typhimurium* durch EcN konnte ebenfalls im modifizierten Invasionsassay mit der humanen Intestinepithelzelllinie Caco-2 und einem *S. typhimurium*-Patientenisolat nachgewiesen werden. Jedoch hatten die deletierten genomischen Inseln in EcN keinen Einfluss auf die Invasionseffizienz von *S. typhimurium* in Caco-2-Zellen. Da auch die Vorinkubation mit *E. coli* MG1655 zur Abnahme der Invasivität geführt hat und zum Teil hohe Standardabweichungen aufgetreten sind, ist der Invasionsassay mit Caco-2-Zellen zur Untersuchung der Invasionshemmung durch EcN nur im Zusammenhang mit weiteren *in vitro* und *in vivo* Testsystemen zu verwenden.

Sowohl bei der Auswertung der Co-Kultur von EcN und Caco-2-Zellen (Abbildung 4. 15) als auch mikroskopisch (Abbildung 4. 16) konnte gezeigt werden, dass EcN ein invasives Potenzial besitzt. Die Invasivität von EcN in Zellkultursystemen wurde bisher noch nicht beschrieben. Jedoch konnte EcN nach oraler Inokulation in gnotobiotischen Mäusen in verschiedenen Organen nachgewiesen werden. Abhängig vom genetischen Hintergrund des Wirts wurde die Inokulation von EcN toleriert oder führte, wie bei C3H/HeJZtm-Mäusen mit TLR4-Defekt, zu Erkrankung und Tod bei mittleren bis schweren Organläsionen. Bei konventionellen Mäusen dieses Stamms wurden keine klinischen Krankheitszeichen nach oraler Inokulation von EcN beobachtet (Bleich et al., 2008).

Unter bestimmten Voraussetzungen wie im artifiziellen System gnotobiotischer Mäuse mit bestimmtem Genotyp oder in der Zellkultur präsentiert EcN einen invasiven Phänotyp. Die Invasivität von EcN ist in der Effizienz nicht zu vergleichen mit der

Invasivität von Salmonellen. Sie liegt jedoch deutlich über dem invasiven Potenzial des K-12-Laborstamms *E. coli* MG1655. Durch Untersuchung weiterer intestinaler Epithelzelllinien ist zu klären, ob die Invasivität von EcN abhängig von der Zelllinie ist.

5.1.3 EcN- ein UPEC ohne zytotoxischen Effekt?

Der uropathogene Stamm *E. coli* CFT073 ist ein Pyelonephritis-Isolat, das zytotoxisches Hämolysin und P-Fimbrien exprimiert (Mobley et al., 1990). Es ist bekannt, dass der Stamm große Ähnlichkeit zu dem Probiotikum EcN aufweist (Grozdanov et al., 2004; Sun et al., 2005). Durch die vollständig annotierte EcN-Sequenz ist erstmals ein direkter und genauer Vergleich mit dem Genom von *E. coli* CFT073 (Welch et al., 2002) auf Nukleotid- und Proteinebene möglich. Die Analyse der Genomstrukturen hat gezeigt, dass EcN und *E. coli* CFT073 nahezu identisch sind (Abbildung 4. 7). Die GI bzw. PAI sind überwiegend homolog. Auf diesen Inseln sind die meisten Virulenz- und Fitnessfaktoren lokalisiert. Auch innerhalb dieser Bereiche ereignen sich durch mobile genetische Elemente weitere Insertionen, Inversionen und Deletionen, wie der Vergleich der GIE_{EcN}II mit PAI-CFT073-*pheV* zeigt. Ein Verlust der Virulenzfaktoren Hämolysin und P-Fimbrien, der offensichtlich in EcN stattgefunden hat (Grozdanov et al., 2004), ist damit zu erklären.

EcN gilt als nicht-pathogener, sicherer Organismus, wie es die Kriterien für Probiotika voraussetzen. Auch für *in situ*-Expressionen therapeutischer Moleküle im Patienten ist der Stamm ein geeigneter Transportorganismus (Westendorf et al., 2005). Das Vorhandensein einer Vielzahl weiterer UPEC-spezifischer Virulenzfaktoren wie der Eisenaufnahmesysteme und Autotransporter (Tabelle 4. 4) stellt in diesem Zusammenhang eine interessante Eigenschaft von EcN dar. Bis auf wenige Ausnahmen, bei denen in der Gensequenz Punktmutationen vorhanden sind oder Insertionen das Gen zerstört haben, enthält EcN alle in *E. coli* CFT073 vorhandenen Virulenzfaktoren (4.1.5).

Unter der Voraussetzung, dass EcN nicht pathogen ist, muss der Begriff Virulenzfaktor in diesem Zusammenhang kritisch hinterfragt werden. Die Untersuchung verschiedener UPEC-Stämme bezüglich der Virulenzdeterminanten hat gezeigt, dass es viele Faktoren gibt, die für UPEC charakteristisch sind. Diese sind jedoch nicht in allen UPEC-Stämmen nachzuweisen (Lloyd et al., 2007), und die Relevanz dieser Virulenzgene für die UPEC-Stämme ist in Bezug auf die Kolonisierungsfähigkeit im Urogenitaltrakt zum

Teil noch ungeklärt. Das Vorkommen einiger dieser Pathogenitätsfaktoren bei Kommensalen deutet auf Vorteile in der Besiedelung und im Konkurrenzkampf um Nischen und Nährstoffe hin. Da das natürliche Habitat kommensaler und extraintestinal pathogener *E. coli* (ExPEC) der Intestinaltrakt von Menschen und Tieren ist und ExPEC bei etwa 20% der Bevölkerung zur Normalflora gehören (Johnson, 1991), können diese Faktoren in erster Linie für die Besiedlung des Gastrointestinaltrakts Vorteile bieten. Die ähnliche Ausstattung mit Genen bezüglich Anpassungsvermögen und Fitness ist damit zu erklären. Der Begriff „Fitnessfaktor“ ist demnach ein allgemeiner Oberbegriff. Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass Fitnessfaktoren wiederum in anderer Umgebung Virulenz erzeugen können. Denn erst nach Besiedlung extraintestinaler Areale wie der Blutbahn und des Urogenitaltrakts sind die ExPEC pathogen. Die Virulenzfaktoren in EcN sind demnach ebenfalls Fitnessfaktoren, die sich positiv auf die Wachstums- und Kolonisierungsfähigkeit von EcN im Kolon auswirken können.

Allerdings ist das invasive Potenzial von EcN nicht außer Acht zu lassen. Die immunstimulatorische Wirkung von EcN, die ohne Auslösung einer Entzündung zur Expression von proinflammatorischen Zytokinen führt (Ukena et al., 2005; Helwig et al., 2006), lässt zusammen mit der Fähigkeit zur Invasivität (4.2.4; (Bleich et al., 2008) auf ein den UPEC ähnliches pathogenes Potenzial schließen und stellt die bisher angenommene Apathogenität von EcN in Frage. Gerade die nahe Verwandtschaft von EcN zu uropathogenen *E. coli* und das Vorhandensein vieler Fitnessfaktoren erschwert die Einordnung in die Gruppe der Kommensalen und zeigt, dass die Unterscheidung zwischen Kommensalen und Pathogenen eine Gratwanderung ist.

Auch der Gebrauch anderer Probiotika wie Lactobazillen und Bifidobakterien offenbarte bereits unerwartete Wirkungen. So führte in einer doppelblinden, randomisierten klinischen Studie die Applikation eines probiotischen Präparates an Patienten mit akuter Pankreatitis bei signifikant mehr Personen zum Tod als bei Patienten der Kontrollgruppe, die nur Placebo erhielten (Besselink et al., 2004; Besselink et al., 2008). Akute Infektionen sind bei akuter Pankreatitis die häufigste Komplikation und Todesursache. Durch die Probiotikatherapie wurde wie bei vorangegangenen Studien eine Wachstumshemmung pathogener Bakterien erwartet. Die errechnete Mortalitätsrate lag jedoch mit 16% in der Behandlungsgruppe deutlich

über der in der Literatur beschriebenen, durchschnittlichen Rate von 10% und der Mortalitätsrate von 6% in der Placebogruppe dieser Studie. Die Ursache für die erhöhte Mortalität infolge multiplen Organversagens in der Probiotikagruppe ist noch unklar. Das in der Studie verwendete probiotische Präparat besteht aus etwa 10^{10} KbE sechs verschiedener probiotischer Stämme (*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. lactis*), das Intensivpatienten in der Akutphase der Erkrankung über eine nasojejunale Sonde appliziert wurde. Es wird vermutet, dass die Menge und Zusammensetzung der probiotischen Bakterien im Jejunum zu einer lokalen Entzündung der Darmwand führt. Die ohnehin schon schlechte Durchblutung wird durch die Entzündung und den zusätzlichen Sauerstoffbedarf der Bakterien weiter reduziert und führt letztendlich zur Ischämie. Auch in anderen Studien wurde eine erhöhte Mortalität nach Verabreichung von Probiotika an schwer kranke Patienten beobachtet (Jain et al., 2004; Heyland et al., 2001; Singhi, 2007; Honeycutt et al., 2007). Die Verwendung von Probiotika ist also nicht vollkommen ungefährlich. Probiotika können dementsprechend nicht mehr als völlig harmlos und sicher angesehen werden. Ein Sicherheitsrisiko besteht besonders bei immunsupprimierten Patienten und bei schweren Grunderkrankungen, so dass von einer Behandlung dieser Patienten mit Probiotika derzeit abgeraten wird (Besselink et al., 2008).

Angesichts des pathogenen Potenzials und der nahen Verwandtschaft zu den uropathogenen *E. coli* stellt sich die Frage, ob EcN unter bestimmten Bedingungen in der Lage ist ein UPEC zu werden. Die Aufnahme von Zytotoxin- und Fimbrienkodierenden DNA-Sequenzen im Rahmen des horizontalen Gentransfers von pathogenen Stämmen, die im Intestinaltrakt angesiedelt sind, wäre ein möglicher Auslöser dafür.

Es wurden jedoch auch *E. coli*-Stämme beschrieben, die eine asymptomatische Bakteriurie (ABU) verursachen, also eine signifikante Bakteriurie ohne Symptome eines Harnwegsinfekts. Vermutlich sind diese ABU-Stämme aus virulenten Stämmen durch Attenuation hervorgegangen, oder sie sind nicht-pathogene Kommensale der intestinalen Mikroflora. Diese Stämme tragen häufig typische UPEC-Virulenzgene wie Fimbrien, Zytotoxine und Siderophorensysteme, die jedoch infolge von

Punktmutationen oder Genomreduktion nicht exprimiert werden oder funktionslos sind. Die Geno- und Phänotypen der ABU-Stämme sind, ebenso wie die der UPEC, diesbezüglich sehr heterogen (Zdziarski et al., 2008; Lloyd et al., 2007). Wie in Abbildung 5. 1 zu sehen ist, tragen die Genomreduktion und der Funktionsverlust einzelner Gene zur Evolution von ABU-Stämmen aus uropathogenen *E. coli* bei. EcN ist nach seiner Genomstruktur und den im Genom enthaltenen Genen nicht nur dem UPEC CFT073 ähnlich, sondern weist auch Gemeinsamkeiten mit ABU-Stämmen auf. EcN kann also anstatt zu den Kommensalen auch in die relativ neue Gruppe der ABU-Stämme gehören.

Daraus ergibt sich die interessante Frage, ob ein Hämolyisin-defizienter *E. coli* CFT073 ein besseres Probiotikum sein kann als EcN und ob sich unter den ABU-Stämmen weitere probiotisch wirkende *E. coli* befinden. Die Untersuchung der ABU-Stämme auf probiotische Eigenschaften und der Vergleich mit EcN kann dabei ein weiterer Schritt auf dem Weg zur Identifikation probiotischer Mechanismen sein.

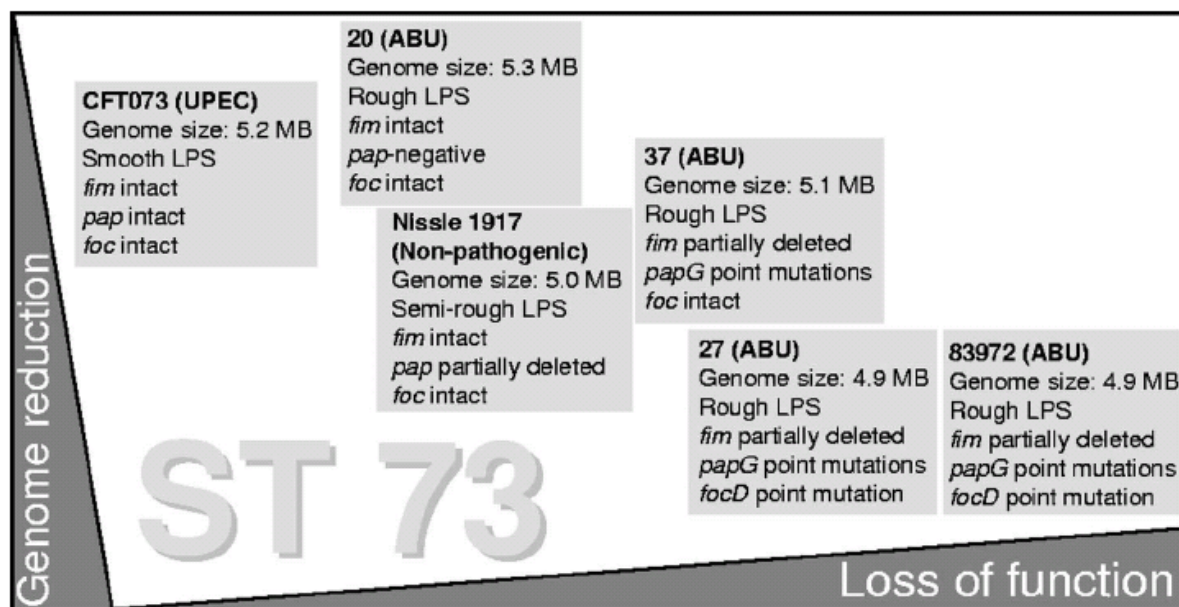


Abbildung 5. 1 Genotypische und phänotypische Diversität nahe verwandter *E. coli*

Die Reduktion des Genoms und der Funktionsverlust von Genen tragen zur Evolution von ABU (apathogene Bakteriurie-Stämme) aus uropathogenen Vorläufern bei. EcN ist durch seine Genomstruktur vergleichbar mit ABU-Stämmen. *fim*: Typ1-Fimbrien; *pap*: P-Fimbrien; *foc*: F1C-Fimbrien; (Zdziarski et al., 2008)

5.1.4 Die Rolle der stammspezifischen Plasmide von EcN

Die Plasmide pMUT1 und pMUT2 von EcN sind stammspezifisch und kodieren Proteine, deren Funktion mit Plasmidmobilisation und -replikation verbunden ist sowie hypothetische Proteine unbekannter Funktion, die kaum Homologien zu bekannten *E. coli*-Genen aufweisen. Des Weiteren enthält pMUT2 ein mögliches RelBE Toxin-Antitoxin-System. Diese Systeme sind definiert als eine Gruppe von Plasmid- oder Chromosom-kodierten Loci, die ein Zelltoxin wie RelE und ein Protein-Antitoxin wie RelB kodieren. Plasmidkodiert stabilisiert dieses System die Replikons durch das Abtöten plasmidfreier Zellen (Gotfredsen und Gerdes, 1998). Die EcN-Plasmide werden also repliziert und sind in nachfolgenden Generationen stabil (Blum-Oehler et al., 2003).

Die Unterschiede in den Sequenzen von pMUT1 und pMUT2 zu bisherigen Publikationen (4.1.2) sind möglicherweise durch die verschiedenen Sequenzierungstechniken entstanden. Der Verlust von bis zu 38 nt bei pMUT2 durch Deletionen ist unwahrscheinlich, obwohl es sich um mobile genetische Elemente handelt. Die in der Regel kurzen Kultivierungen und das Zurückgreifen auf Material direkt aus der Stammsammlung minimiert die Wahrscheinlichkeit für die Selektion von Spontanmutationen unter Laborbedingungen.

Stammspezifische Plasmide finden sich auch bei anderen *E. coli* (Tabelle 4. 1). Die Größe und damit die Anzahl und Art der darauf kodierten Gene kann bei einigen Stämmen einen Einfluss auf die Pathogenität oder Fitness haben. Beispielsweise enthält das Plasmid pAPEC-O1-ColBM des Stamms *E. coli* APEC O1 die Virulenz-assoziierten Gencluster der Eisenaufnahmesysteme *sitABCD*, Aerobactin und Salmochelin (Tabelle 4. 5), Hämagglutinin (*tsh*), das in die Serumresistenz (Komplementsystem) involvierte *iss* und die Colicine B und M (Johnson et al., 2006). pSMS35_130 kodiert ebenfalls das Eisenaufnahmesystem *sitABCD*. Das Plasmid pO157 von EHEC EDL933 und das EAF-Plasmid von EPEC kodieren verschiedene Virulenzfaktoren, deren Rolle in der Pathogenese der Diarrhö bis heute jedoch unklar ist (Yoon und Hovde, 2008). Mit Hilfe der Suizidvektormethode lässt sich der Plasmidverlust eines oder beider Plasmide von EcN herbeiführen (2.2.2.14). Da die Plasmide unter Laborbedingungen bisher keinen Einfluss auf das Wachstum von EcN und insbesondere auf die Regulation von MCP-1 und ZO-1 (4.2.1.2) und andere

probiotische Eigenschaften gezeigt haben (Altenhoefer et al., 2004), bleibt die Bedeutung der Plasmide für EcN ebenfalls unklar.

pMUT1 ist homolog zu pCRP3 von *Citrobacter rodentium* und p9705 von *E. coli* O157:H7. *Citrobacter rodentium* ist ein Mauspathogen und nahe verwandt zu *E. coli*. Der Stamm wird als Modellorganismus in Maus-Enteritis-Modellen eingesetzt und verursacht EPEC-artige Läsionen im Darm der Mäuse (Mundy et al., 2005). pMUT2 ist homolog zu dem Plasmid pUB6060 von *Plesiomonas shigelloides*, unterscheidet sich jedoch in der Größe und der kodierten Anzahl der Gene. Übereinstimmungen mit anderen Sequenzen der Nukleotiddatenbanken sind bisher nicht bekannt. Keines dieser Plasmide kodiert bekannte Virulenzfaktoren. Sowohl *C. rodentium* als auch *P. shigelloides* sind jedoch Pathogene. *Plesiomonas* ssp. aus der Familie *Vibrionaceae* ist ein in den Tropen häufig isoliertes Bakterium, das in Oberflächengewässern vorkommt und über Wasser, Fisch und Meeresfrüchte übertragen wird und dann Erreger von intestinalen und extraintestinalen Erkrankungen ist. *In vitro* konnten Adhärenz und Invasion in Caco-2-Zellen nachgewiesen werden. Die Art *Plesiomonas shigelloides* umfasst verschiedene pathogene Phänotypen, wie sie auch in der Gattung *E. coli* vorhanden sind (Theodoropoulos et al., 2001). Für pMUT1 und pMUT2 von EcN kann eine Transkonjugation von den Pathogenen angenommen werden, wie sie von APEC auf kommensale *E. coli* unter Laborbedingungen in Bezug auf die Rolle in der Virulenz getestet wurde (Skyberg et al., 2006). Eine Weiterentwicklung von EcN zum UPEC oder einem anderen Phänotyp ist also nicht auszuschließen.

5.1.5 Genregulation in EcN durch den alternativen Sigmafaktor RpoS

Die RNA-Polymerase-Untereinheit RpoS gilt als der Hauptregulator der generellen Stressantwort bei *E. coli* und ersetzt den vegetativen Sigma-Faktor RpoD. RpoS und RpoS-abhängige Gene werden unter einer Vielzahl von Einflüssen wie schlechten Wachstumsbedingungen in der stationären Wachstumsphase oder unter Säurestress induziert und beeinflussen die Zellphysiologie. Etwa 10% aller Gene in *E. coli* werden durch RpoS reguliert, während RpoS selbst von CRP reguliert wird (Abbildung 5. 2). Es handelt sich hier um ein umfassendes regulatorisches Netzwerk aus Signalkaskaden und regulatorischen Kaskaden, die die Expression von Genen kontrollieren (Weber et al., 2005). Die RpoS-Regulation selbst kann auf der Ebene der Transkription, Translation

oder auch posttranslational und durch Degradation stattfinden (Hengge-Aronis, 2002). Die Induktion durch Säurestress, die in den Experimenten angewendet wurde, bedient nur einen kleinen Aspekt der Regulationskaskade. Versuche dieser Art lassen sich jedoch mit guter Reproduzierbarkeit durchführen. Die Induktion von RpoS durch Hitze oder oxidativen Stress (H_2O_2) zeigte keine signifikanten Unterschiede. Diese Tests wurden deshalb nicht weiter verfolgt.

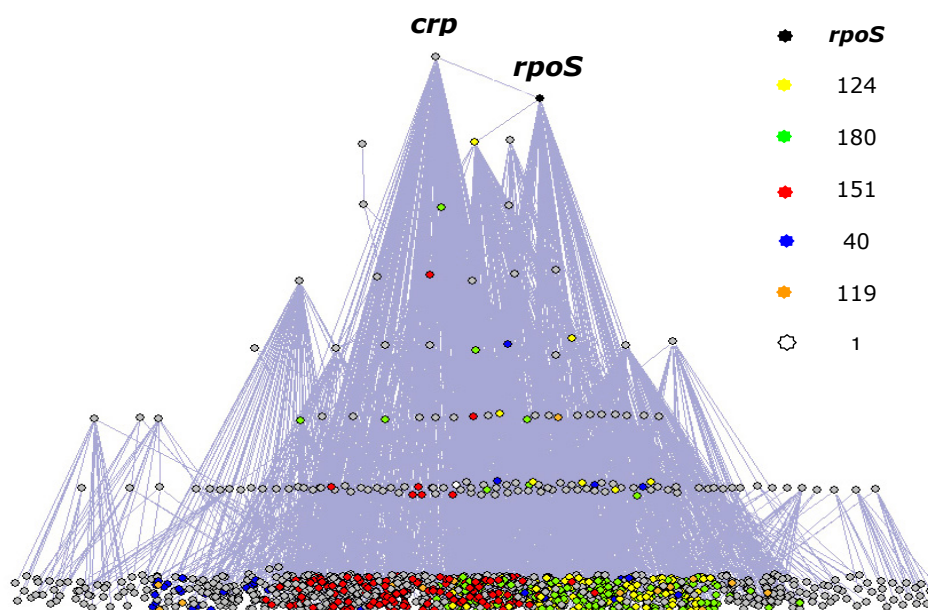


Abbildung 5.2 Regulatorisches Netzwerk der CRP- und RpoS-abhängigen Transkription in *E. coli*

RpoS, eine Untereinheit der RNA-Polymerase, ist ein Hauptregulator der generellen Stressantwort in *E. coli* und beeinflusst die Zellphysiologie unter suboptimalen Wachstumsbedingungen. Die Transkription von *rpos* wird von Crp reguliert. RpoS selbst reguliert die Transkription vieler Gene direkt oder indirekt auf verschiedenen Ebenen. Die Gene sind durch farbige Punkte dargestellt. Ein Protein, das ein Gen reguliert, ist mit diesem verbunden. Die Farben entsprechen der Regulationsebene, und die Anzahl der auf dieser Ebene regulierten Gene ist in der Legende am rechten Bildrand angegeben. Modifiziert nach Ma et al., 2004

Wie in Abschnitt 4.1.7 gezeigt werden konnte, besitzt EcN ein voll funktionsfähiges RpoS, das in Komplementationsversuchen zur Wiederherstellung der Säureresistenz einer *rpoS*-Deletionsmutante geführt hat, während Komplementationen mit dem gleichen Plasmid in EcN Wildtyp und der Genaustauschmutante EcN-*rpoS*^{CFT} nur einen schwächeren Einfluss auf die Säureresistenz hatte. Eine leichte Steigerung der Säureresistenz konnte dagegen bei EcN pDS4 und *E. coli* CFT073 pDS4 nach Säureadaptation beobachtet werden. Die Erhöhung der *rpoS*-Kopienzahl und

Säureadaptation reichen jedoch nicht aus, um die gleiche Säureresistenz wie der Kontrollstamm *E. coli* 126814 zu erlangen. Die RpoS-Regulation in EcN entspricht im Phänotyp einer *rpoS*-Deletionsmutante. Es scheint demnach in EcN weitere Mechanismen geben, die einen regulatorischen Einfluss auf *rpoS* ausüben (Coldewey et al., 2007). Somit ist es möglich, dass eine Regulation durch ein Feedback bereits regulierter Gene eine Rolle in der RpoS-Expression insbesondere bei EcN spielen kann.

Im Mausmodell wurde gezeigt, dass ein funktionelles *rpoS* bei der Besiedelung des Kolons ein Nachteil sein kann, da *rpoS*-Deletionsmutanten in deutlich höherer Anzahl im Kolon nachzuweisen waren als der Wildtyp-Stamm (Krogfelt et al., 2000). EcN gilt als guter Besiedler des Darms in Mensch und Tier und wird von Erwachsenen als Therapeutikum täglich in hohen Dosen von mindestens $2 \cdot 25 \cdot 10^9$ KbE eingenommen (Mutaflor[®], Ardeypharm GmbH, Herdecke). Dadurch wird die Menge der überlebenden EcN nach der Magen-Darm-Passage erhöht. Zusätzlich kann eine modifizierte Regulation des *rpoS*, wie sie für EcN gezeigt wurde, die Fitness des Stamms und dadurch die Konkurrenzfähigkeit während der Darmbesiedlung abhängig von den Wachstumsbedingungen verbessern. Die genauen Mechanismen dazu sind noch unklar und müssen weiter untersucht werden.

Eine modifizierte Funktion von RpoS bezüglich der Stresstoleranz wurde auch in einigen K-12-Stämmen und EHEC-Isolaten gefunden, so dass die Funktion von RpoS innerhalb der Art *E. coli* als heterogen einzustufen ist (Coldewey et al., 2007; King et al., 2004; Bhagwat et al., 2006).

5.2 Bedeutung intestinal *in vivo* regulierter Gene für den probiotischen Charakter von EcN

Promotor-Reporter-Fusionen werden im Allgemeinen eingesetzt, um die promotor-abhängige Expression eines Proteins zu untersuchen. Die Erstellung von Promotor-Reporter-Fusionsbibliotheken dagegen soll Hinweise auf Promotoren geben, die in bestimmten Situationen aktiv sind. Auf diese Weise konnten für *Staphylococcus aureus* Virulenz-assoziierte Gene identifiziert werden, die in einem Mausmodell bei der Pathogenese eines Nierenabszesses exprimiert werden (Lowe et al., 1998). Auch für die Herstellung von Vakzinen gegen Salmonellen wurde eine Promotorbank verwendet.

Dabei wurden Kandidatengene identifiziert, die von Salmonellen nach Invasion ins Gewebe besonders stark exprimiert werden (Rollenhagen et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Promotorbank von EcN verwendet, um erstmalig Promotoren zu identifizieren, die ausschließlich *in vivo* im Darm aktiv sind. Die korrespondierenden Gene sollten Hinweise über weitere probiotische Wirkmechanismen des Stamms liefern.

Die Reihenfolge der Versuche (Maus-Kultur-Maus) wurde so gewählt, dass aus der Menge der im murinen Intestinum aktiven Promotoren die konstitutiven Promotoren aussortiert werden. Dadurch sollte bei einer im Vorfeld stattfindenden Sortierung verhindert werden, dass bestimmte Promotoren frühzeitig ausgeschlossen werden. Die Verfütterung der ursprünglichen Promotorbank von EcN an Mäuse bot zudem die Möglichkeit, die Promotorbank und die Faeces mikroskopisch hinsichtlich der GFP-Expression in EcN durch konstitutive Promotoren zu kontrollieren. Die Reinokulation der zweifach sortierten Bakterien sollte diejenigen Promotoren bestätigen, die ausschließlich intestinal *in vivo* aktiv sind. Die hieraus erhaltenen Listen der intestinal *in vivo* regulierten Gene (Tabelle 4. 9 und Tabelle 4. 10) sind die Grundlage für weitere Experimente. Schwierigkeiten ergeben sich jedoch dadurch, dass die Sortierung der Faeces, die eine große Menge an Bakterien enthalten, nahe am Geräterauschen des Durchflusszytometers stattfindet. Dadurch ist eine eindeutige Sortierung nur schwer möglich, wie auch die Reinheit der Reanalysen der Proben gezeigt hat. Die Begleitflora der konventionellen Mäuse sowie Nahrungspartikel stören die Sortierung zusätzlich durch Autofluoreszenz. Große Partikel führen dabei möglicherweise zur Sortierung falsch positiver Bakterien. Für weitere Arbeiten dieser Art muss die Sortierung durch Zuhilfenahme weiterer Fluoreszenzkanäle oder durch Gegenfärbung der Promotorbank-Bakterien mit Antikörpern oder einen Oberflächenfarbstoff, der die Anzucht der Bakterien im Anschluss an die Sortierung nicht beeinträchtigt, optimiert werden.

Die Analyse der Promotoren durch einen Reportergenassay *in vitro* mit dem Luciferin-Luciferase-System (4.3.5) hat gezeigt, dass einige der identifizierten Promotoren durchaus *in vitro* aktiv sind. Das Biolumineszenz-System ist jedoch sensitiver als die GFP-Expression der Promotorbank-Versuche. GFP akkumuliert in den Bakterien und wird erst bei ausreichender Menge detektiert. Bei der Expression geringer Mengen von GFP durch schwache oder streng regulierte Promotoren zum Zeitpunkt der Sortierung,

werden Bakterien als negativ sortiert, die z.B. nach längerer Wachstumszeit durch GFP-Akkumulation als positiv sortiert werden. Die Überprüfung der als intestinal *in vivo* aktiv identifizierten Promotoren mit dem Reporterassay erweist sich deshalb als sinnvoll. Die Regulation der Promotoren in Abhängigkeit der Wachstumsphase kann dabei recht genau beobachtet werden. Neben Promotoren, die von Beginn des Assays an konstant aktiv sind, nimmt die Aktivität einiger Promotoren ab, während die Aktivität anderer Promotoren erst im Verlauf der Kultivierung zunimmt. Die Promotoraktivität bzw. die Regulation dieser Promotoren ist abhängig von der Wachstumsphase, der Bakteriendichte oder einem Nahrungsmangel.

Aus den erhaltenen Datenmengen konnte bisher ein *in vitro* nicht aktiver Promotor identifiziert werden. Die korrespondierenden Gene zu dem Promotor des Konstrukts pDS26 sind nicht näher charakterisierte, hypothetische Proteine, die zwar nicht stammspezifisch sind, jedoch nur zu Genen der UPEC-Stämme, APEC O1, EHEC EDL933 und O157:H7 Sakai und des Kommensalen *E. coli* HS ortholog sind. Ein pathogenes oder zumindest immunstimulatorisches Potenzial dieser Proteine mit Bezug zu probiotischen Wirkmechanismen ist daher möglich. In weiteren Experimenten wie dem Reporterassay und der Biolumineszenzmessung *in vivo* im Mausmodell (4.3.5.2 und 4.3.5.3), Komplementationsversuchen und der Proteinüberexpression muss der Einfluss der Proteine auf den probiotischen Charakter von EcN weiter untersucht werden. Der Biolumineszenzassay im Tiermodell kann für die Beobachtung der Darmpassage und der Aktivität der Promotoren abhängig von der Zeit nach Inokulation und der Lokalisation im Gastrointestinaltrakt eingesetzt werden. Neben weiteren Konstrukten der intestinal *in vivo* regulierten Promotoren kann auch die Untersuchung des *rpoS*-Promotors von EcN während der Darmpassage Aufschluss über die regulatorischen Mechanismen geben. Der Biolumineszenzassay muss für Versuche dieser Art optimiert werden.

Trotz der Annahme, dass im Darm ein anaerobes Milieu herrscht, ist die Entwicklung von Biolumineszenz mit dem sauerstoffabhängigen Luciferin-Luciferase-System möglich. Wie schon Wiles et al. (Wiles et al., 2004) gezeigt haben, ist die Durchblutung des Gewebes essentiell für eine ausreichende Sauerstoffzufuhr. Das bedeutet, dass es auch im Darm Areale mit Sauerstoff gibt, die bevorzugt von fakultativ anaeroben Bakterien wie *E. coli* besiedelt werden. Die Wirkung von EcN auf das Darmepithel wird

vermutlich durch die Ansiedlung im Bereich der Epithelzellen hervorgerufen. Die Epithelzellen werden durch die Mucus-Schicht des Kolons in der Regel vor dem Kontakt mit den Bakterien des Lumens bewahrt, da sowohl Mucus-Schicht als auch Epithelzellen durch die Abwehrreaktionen der Kolonzellen nahezu frei von Bakterien sind. Entzündungen des Kolons z.B. bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen sind immer von einer Verminderung und von Einschnitten der Mucus-Schicht begleitet. Die Immunabwehr ist dann nicht mehr in der Lage, die Migration, Adhäsion und Invasion von Bakterien zu verhindern (Swidsinski et al., 2007). Bei milden Entzündungen ist es vorstellbar, dass EcN in solchen Situationen durch die Lokalisation nahe der Epithelien mit seinen Stoffwechselprodukten und Strukturkomponenten, die zum Teil speziell *in vivo* exprimiert werden, durch die Modulation der Immunantwort einen positiven Effekt für den Wirt hat. Das pathogene Potenzial des Stamms darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, da eine Umkehrung vom gesundheitsfördernden zum pathogenen Bakterium bei schwer kranken Patienten nicht auszuschließen ist.

5.3 Forderungen an das Probiotikum *E. coli* Nissle 1917

Probiotika müssen eine Reihe von Kriterien erfüllen, damit sie unter dieser Bezeichnung auf den Markt gebracht werden dürfen. Zu diesen Kriterien gehören u.a. der Ausschluss von Pathogenitätsfaktoren, Resistenz gegenüber Magensäure und Galle, Fähigkeit zur Adhärenz an Kolon-Epithelzellen, Fähigkeit zur Kolonisierung, Aktivität zur Kolonisierungsresistenz pathogener Bakterien und die Sicherheit (1.6.1). Im Laufe der molekularen Analyse des probiotischen Stamms *E. coli* Nissle 1917 hat sich gezeigt, dass der Stamm einige dieser Kriterien nicht erfüllt. EcN besitzt Pathogenitäts- bzw. Fitnessfaktoren der UPEC und ist diesen nahe verwandt. Die Aufnahme von Pathogenitätsfaktoren durch horizontalen Gentransfer ist nicht auszuschließen und kann zur Ausprägung eines pathogenen Phänotyps führen. Untersuchungen *in vitro* zeigen, dass der Stamm kaum säureresistent ist. Trotzdem oder auch deswegen ist EcN in der Regel ein guter Besiedler des Kolons von Säugetieren mit antagonistischer Wirkung auf pathogene Bakterien. EcN selbst ist im hier gewählten Zellkulturmodell jedoch invasiv. Die propagierte Sicherheit des Stamms ist dadurch nicht gewährleistet. Es ist deshalb

dringend notwendig, die Eigenschaften von EcN genauer zu untersuchen, um die Risiken für Patienten bei der Einnahme von EcN zu vermindern. Gleichzeitig kann eine gentechnische Veränderung von EcN durch Deletion der mobilen genetischen Elemente zur Stabilisierung des Genoms beitragen und die Sicherheit des Stamms bezüglich der Veränderungen des Genoms und damit der probiotischen Eigenschaften erhöhen, so dass ein Einsatz als Transportvehikel für die *in situ* Expression therapeutischer Moleküle auch bei schwer kranken Patienten möglich wird. Mit dieser Arbeit sind die Grundlagen für die Optimierung dieses erfolgreichen und inzwischen in der Anwendung weit verbreiteten Probiotikums EcN gegeben.

6 Zusammenfassung/ Summary

6.1 Zusammenfassung

Der probiotische Stamm *E. coli* Nissle 1917 ist ein Fäkalisolat, das in der Medizin traditionell zur Behandlung verschiedener gastrointestinaler Erkrankungen eingesetzt wird. Durch erfolgversprechende klinische Studien zur Remissionserhaltung bei Colitis ulcerosa, bei denen EcN als therapeutische Alternative zur Standardmedikation eingesetzt wird, ist das Interesse an den Wirkmechanismen von Probiotika stark gestiegen. EcN gehört derzeit zu den am besten untersuchten Probiotika. Einige Wirkmechanismen konnten dadurch schon aufgeklärt werden. So sind vermutlich Strukturkomponenten und stammspezifische Syntheseleistungen an der Ausprägung des probiotischen Phänotyps von EcN beteiligt. Schlüssige Konzepte, die über Gene, Genprodukte und molekulare Mechanismen den probiotischen Effekt von EcN erklären, fehlen bislang.

Im Rahmen dieser Arbeit wird das Genom von EcN analysiert und auf der Basis der Genomsequenz mit anderen *E. coli*-Stämmen verglichen. Mit Hilfe einer Promotor-Reporter-Fusionsbibliothek (Promotorbank) werden intestinal *in vivo* regulierte Gene identifiziert und dadurch neue Ansätze zur Untersuchung der probiotischen Eigenschaften von EcN geschaffen.

Die Grundlage für die molekulare Analyse von EcN ist die manuelle Nachannotation seines sequenzierten Genoms. Die EcN-Sequenz wird mit 13 weiteren annotierten *E. coli*-Sequenzen verglichen. Nach dieser Analyse kodiert EcN derzeit 121 stammspezifische Gene. Die Genomstruktur ist mit den enthaltenen genomischen Inseln und Prophagen dem Genom des uropathogenen *E. coli* CFT073 sehr ähnlich. Mit wenigen Ausnahmen kodiert EcN alle in *E. coli* CFT073 vorhandenen Virulenz- und Fitnessfaktoren, so dass auf der Nukleotidebene die nahe Verwandtschaft dieser beiden Stämme bestätigt werden kann. Zudem kann gezeigt werden, dass EcN in artifiziellen Systemen wie der Zellkultur oder gnotobiotischen Mäusen ein pathogenes Potenzial hat, obgleich die Kolonisierungsfähigkeit pathogener Bakterien durch Inkubation mit EcN herabgesetzt wird. Eine wichtige Rolle bei der Besiedlung des Intestinaltrakts und der

Immunstimulation von Darmepithelzellen spielt auch die globale Regulation der Genaktivität bei EcN durch den alternativen Sigma-Faktor RpoS, der im Gegensatz zu *rpoS*-Deletionsmutanten zu einer gesteigerten mRNA-Expression des Tight-junction Proteins ZO-1 führt. Des Weiteren führte die Untersuchung von EcN-Deletionsmutanten zu der Schlussfolgerung, dass einige genomische Inseln für Eigenschaften, die das probiotische Verhalten erklären können, eine Rolle spielen.

Durch den Einsatz einer Promotorbank von EcN in konventionellen und gnotobiotischen Mäusen werden erstmalig Sequenzen von intestinal *in vivo* aktiven Promotoren identifiziert. Der Aufbau eines Promotor-Reportergen-Assays mit dem Biolumineszenz erzeugenden *luxCDABE*-Operon ermöglichte die Untersuchung ausgewählter Promotoren *in vitro*. Mit einem *In Vivo* Imaging System (IVIS) kann in weiteren Experimenten die Aktivität dieser Promotoren in lebenden Mäusen untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wird gezeigt, dass EcN kein vollkommen harmloser probiotischer Stamm ist. Weitere Informationen über EcN sind deshalb wichtig für eine optimierte Anwendung als Therapeutikum. Die molekulare Analyse ist somit eine unbedingt notwendige Grundlage für weiterführende Untersuchungen der Eigenschaften von EcN, die für seinen probiotischen Charakter verantwortlich sind.

6.2 Summary

The probiotic *E. coli* Nissle 1917 is a fecal isolate which is traditionally used for treatment of various gastrointestinal disorders. In clinical trials where EcN was used as therapeutic alternative for remission maintenance of ulcerative colitis compared to standard medication, promising results led to an increased interest in probiotics. Today, EcN is one of the best studied probiotics. Therefore, several mechanisms of action could be enlightened. Structural components and strain-specific products are responsible for its probiotic effects. But conclusive concepts about genes, gene products and molecular mechanisms that really contribute to the probiotic character of EcN have not been offered so far.

In order to create new possibilities to elucidate the probiotic traits of EcN the genome is analysed by taking this as a basis for comparison to other *E. coli* genomes and identification of intestinal *in vivo* regulated genes using a promoter-trap-library.

The sequenced EcN genome is annotated and compared to 13 other so far annotated *E. coli* genomes. Concerning these analyses EcN encodes 121 strain-specific genes. The genome structure including the genomic islands and prophages is highly homolog to the uropathogenic *E. coli* CFT073. EcN encodes most of the virulence and fitness factors that are present in *E. coli* CFT073. Therefore, the close relationship of these two strains is confirmed at nucleotide level. Furthermore, it is shown that in artificial systems like cell culture assays and gnotobiotic mice EcN reveals a pathogenic potential although EcN is able to decrease colonization efficiency of pathogenic bacteria. The alternative sigma factor RpoS that is responsible for global regulation and activity of several genes seems to play an important role during colonization of EcN in the intestine and its immunostimulatory effects on intestinal epithelial cells. Investigation of EcN-deletion mutants lacking genomic islands and prophages lead to the conclusion that some genomic islands may play a role for specific probiotic traits.

This is the first time where a promoter-trap-library was used in conventional and gnotobiotic mice for collection of intestinal *in vivo* active promoters. Constructing and establishing a promoter-reporter gene assay with the bioluminescent *luxCDABE* operon made the investigation of selected promoters *in vitro* possible as well as establishing a bioluminescence assay using an *In Vivo* Imaging System (IVIS) for investigation of promoter activity in living mice.

In this research project was shown that EcN is not a completely harmless probiotic. The genome structure and regulatory mechanisms of gene expression are the strain's molecular traits that lead to probiotic activity and immunostimulatory effects. Therefore, the molecular analyses presented here, together with the complete genome sequence, are a basis for further investigations of mechanisms that are responsible for the probiotic effects of EcN.

7 Literatur

- Abe, C.M., Salvador, F.A., Falsetti, I.N., Vieira, M.A., Blanco, J., Blanco, J.E., Blanco, M., Machado, A.M., Elias, W.P., Hernandez, R.T., and Gomes, T.A. (2008). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52, 397-406.
- Adler, S.N. (2006). The probiotic agent *Escherichia coli* M-17 has a healing effect in patients with IBS with proximal inflammation of the small bowel. *Dig Liver Dis* 38, 713.
- Albert, M.J., Mathan, V.I., and Baker, S.J. (1980). Vitamin B12 synthesis by human small intestinal bacteria. *Nature* 283, 781-782.
- Altenhoefer, A., Oswald, S., Sonnenborn, U., Enders, C., Schulze, J., Hacker, J., and Oelschlaeger, T.A. (2004). The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 40, 223-229.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.
- Araya, M., Morelli, L., Reid, G., Sanders, M. E., Stanton, C., Pineiro, M., and Ben Embarek, P. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. 2002. www.who.int/foodsafety
- Bach, S., Buchrieser, C., Prentice, M., Guiyoule, A., Msadek, T., and Carniel, E. (1999). The high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica* Ye8081 undergoes low-frequency deletion but not precise excision, suggesting recent stabilization in the genome. *Infect Immun* 67, 5091-5099.
- Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Nat Acad Sci USA* 101, 15718-15723.
- Bekal, S., Brousseau, R., Masson, L., Prefontaine, G., Fairbrother, J., and Harel, J. (2003). Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *J Clin Microbiol* 41, 2113-2125.
- Berg, R.D. (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* 4, 430-435.
- Besselink, M.G., Timmerman, H.M., Buskens, E., Nieuwenhuijs, V.B., Akkermans, L.M., and Gooszen, H.G. (2004). Probiotic prophylaxis in patients with predicted severe acute pancreatitis (PROPATRIA): design and rationale of a double-blind, placebo-controlled randomised multicenter trial [ISRCTN38327949]. *BMC Surg* 4, 12.
- Besselink, M.G., van Santvoort, H.C., Buskens, E., Boermeester, M.A., van Goor, H., Timmerman, H.M., Nieuwenhuijs, V.B., Bollen, T.L., van Ramshorst, B., Witteman, B.J., Rosman, C., Ploeg, R.J., Brink, M.A., Schaapherder, A.F., Dejong, C.H., Wahab, P.J., van Laarhoven, C.J., van der Harst, E., van Eijck, C.H., Cuesta, M.A., Akkermans, L.M., and Gooszen, H.G. (2008). Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 371, 651-659.
- Bhagwat, A.A., Tan, J., Sharma, M., Kothary, M., Low, S., Tall, B.D., and Bhagwat, M. (2006). Functional heterogeneity of RpoS in stress tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 72, 4978-4986.

- Bingle, L.E., Bailey, C.M., and Pallen, M.J. (2008). Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr Opin Microbiol* 11, 3-8.
- Bischoff, S.C. and Manns, M.P. (2005). Probiotika, Präbiotika und Synbiotika. *Deutsches Ärzteblatt* 102.
- Blattner, F.R., Plunkett, G.I., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., and Shao, Y. (1997). The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453-1462.
- Blaut, M. and Clavel, T. (2007). Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *J Nutr* 137, 751S-755S.
- Bleich, A., Sundberg, J.P., Smoczek, A., von Wasielewski, R., de Buhr, M.F., Janus, L.M., Julga, G., Ukena, S.N., Hedrich, H.-J., and Gunzer, F. (2008). Sensitivity to *Escherichia coli* Nissle 1917 in mice is dependent on environment and genetic background. *Int J Exp Path* 89, 45-54.
- Blum, G., Falbo, V., Caprioli, A., and Hacker, J. (1995a). Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and alpha-hemolysin form the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. *FEMS Microbiol Lett* 126, 189-195.
- Blum, G., Marre, R., and Hacker, J. (1995b). Properties of *Escherichia coli* strains of serotype O6. *Infection* 23, 234-236.
- Blum-Oehler, G., Oswald, S., Eiteljorge, K., Sonnenborn, U., Schulze, J., Kruis, W., and Hacker, J. (2003). Development of strain-specific PCR reactions for the detection of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 in fecal samples. *Res Microbiol* 154, 59-66.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., and Boyer, H.W. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95-113.
- Boman, H.G. (2003). Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med* 254, 197-215.
- Boudeau, J., Glasser, A.L., Julien, S., Colombel, J.F., and Darfeuille-Michaud, A. (2003). Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 18, 45-56.
- Boudeau, J., Glasser, A.L., Masseret, E., Joly, B., and Darfeuille-Michaud, A. (1999). Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* 67, 4499-4509.
- Bryan, A., Roesch, P., Davis, L., Moritz, R., Pellett, S., and Welch, R.A. (2006). Regulation of type 1 fimbriae by unlinked FimB- and FimE-like recombinases in uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073. *Infect Immun* 74, 1072-1083.
- Brzuszkiewicz, E., Bruggemann, H., Liesegang, H., Emmerth, M., Olschlager, T., Nagy, G., Albermann, K., Wagner, C., Buchrieser, C., Emody, L., Gottschalk, G., Hacker, J., and Dobrindt, U. (2006). How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc Nat Acad Sci USA* 103, 12879-12884.
- Bultreys, A., Gheysen, I., and de Hoffmann, E. (2006). Yersiniabactin production by *Pseudomonas syringae* and *Escherichia coli*, and description of a second yersiniabactin locus evolutionary group. *Appl Environ Microbiol* 72, 3814-3825.

- Bumann,D. (2002). Examination of *Salmonella* gene expression in an infected mammalian host using the green fluorescent protein and two-colour flow cytometry. *Mol Microbiol* 43, 1269-1283.
- Caballero-Franco,C., Keller,K., De Simone,C., and Chadee,K. (2007). The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G315-G322.
- Candela,M., Seibold,G., Vitali,B., Lachenmaier,S., Eikmanns,B.J., and Brigidi,P. (2005). Real-time PCR quantification of bacterial adhesion to Caco-2 cells: competition between bifidobacteria and enteropathogens. *Res Microbiol* 156, 887-895.
- Cartron,M.L., Maddocks,S., Gillingham,P., Craven,C.J., and Andrews,S.C. (2006). Feo-transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals* 19, 143-157.
- Castresana,J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 17, 540-552.
- Cebra,J.J. (1999). Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr* 69, 1046S-1051S.
- Chen,S.L., Hung,C.S., Xu,J., Reigstad,C.S., Magrini,V., Sabo,A., Blasiar,D., Bieri,T., Meyer,R.R., Ozersky,P., Armstrong,J.R., Fulton,R.S., Latreille,J.P., Spieth,J., Hooton,T.M., Mardis,E.R., Hultgren,S.J., and Gordon,J.I. (2006). Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach. *Proc Nat Acad Sci USA* 103, 5977-5982.
- Cho,J.H. (2008). The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 8, 458-466.
- Chouikha,I., Germon,P., Bree,A., Gilot,P., Moulin-Schouleur,M., and Schouler,C. (2006). A *selC*-associated genomic island of the extraintestinal avian pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908 is involved in carbohydrate uptake and virulence. *J Bacteriol* 188, 977-987.
- Coldewey,S.M., Hartmann,M., Schmidt,D.S., Engelking,U., Ukena,S.N., and Gunzer,F. (2007). Impact of the *rpoS* genotype for acid resistance patterns of pathogenic and probiotic *Escherichia coli*. *BMC Microbiol* 7, 21.
- Cosloy,S.D. and McFall,E. (1973). Metabolism of D-serine in *Escherichia coli* K-12: mechanism of growth inhibition. *J Bacteriol* 114, 685-694.
- Cukrowska,B., LodInova-Zadnlkova,R., Enders,C., Sonnenborn,U., Schulze,J., and Tlaskalova-Hogenova,H. (2002). Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. *Scand J Immunol* 55, 204-209.
- D'Haens,G.R., Geboes,K., Peeters,M., Baert,F., Penninckx,F., and Rutgeerts,P. (1998). Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* 114, 262-267.
- Darfeuille-Michaud,A. (2002). Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *Int. J Med. Microbiol* 292, 185-193.
- Darfeuille-Michaud,A., Boudeau,J., Bulois,P., Neut,C., Glasser,A.L., Barnich,N., Bringer,M.A., Swidsinski,A., Beaugerie,L., and Colombel,J.F. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127, 412-421.
- Darling,A.C., Mau,B., Blattner,F.R., and Perna,N.T. (2004). Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res* 14, 1394-1403.

- de Vrese, M. and Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 111, 1-66.
- Deshpande, G., Rao, S., and Patole, S. (2007). Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet* 369, 1614-1620.
- Deyneko, I.V., Kel, A.E., Bloecker, H., and Kauer, G. (2005). Signal-theoretical DNA similarity measure revealing unexpected similarities of *E. coli* promoters. *In Silico Biol* 5, 547-555.
- Dobrindt, U., Agerer, F., Michaelis, K., Janka, A., Buchrieser, C., Samuelson, M., Svanborg, C., Gottschalk, G., Karch, H., and Hacker, J. (2003). Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J Bacteriol* 185, 1831-1840.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., and Hacker, J. (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2, 414-424.
- Dobrindt, U. and Reidl, J. (2000). Pathogenicity islands and phage conversion: evolutionary aspects of bacterial pathogenesis. *Int J Med Microbiol* 290, 519-527.
- Donnenberg, M.S. and Kaper, J.B. (1992). Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 60, 3953-3961.
- Drakes, M., Blanchard, T., and Czinn, S. (2004). Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. *Infect Immun* 72, 3299-3309.
- Drewinko, B., Romsdahl, M.M., Yang, L.Y., Ahearn, M.J., and Trujillo, J.M. (1976). Establishment of a human carcinoembryonic antigen-producing colon adenocarcinoma cell line. *Cancer Res* 36, 467-475.
- Dryselius, R., Nikraves, A., Kulyte, A., Goh, S., and Good, L. (2006). Variable coordination of cotranscribed genes in *Escherichia coli* following antisense repression. *BMC Microbiol* 6, 97.
- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G.I., Burland, V., Mau, B., Petrosino, J.F., Qin, X., Muzny, D.M., Ayele, M., Gibbs, R.A., Csorgo, B., Posfai, G., Weinstock, G.M., and Blattner, F.R. (2008). The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J Bacteriol* 190, 2597-2606.
- Eaves-Pyles, T., Allen, C.A., Taormina, J., Swidsinski, A., Tutt, C.B., Jezek, G.E., Islas-Islas, M., and Torres, A.G. (2008). *Escherichia coli* isolated from a Crohn's disease patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal epithelial cells. *Int J Med Microbiol* 298, 397-409.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., and Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635-1638.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32, 1792-1797.
- Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kiessling, S., Alt, K., Antao, E.M., Laternus, C., Diehl, I., Glodde, S., Homeier, T., Bohnke, U., Steinruck, H., Philipp, H.C., and Wieler, L.H. (2007). Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int J Med Microbiol* 297, 163-176.
- Feher, T., Karcagi, I., Gyorfy, Z., Umenhoffer, K., Csorgo, B., and Posfai, G. (2008). Scarless engineering of the *Escherichia coli* genome. *Methods Mol Biol* 416, 251-259.
- Feher, T., Papp, B., Pal, C., and Posfai, G. (2007). Systematic genome reductions: theoretical and experimental approaches. *Chem Rev* 107, 3498-3513.

- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17, 368-376.
- Fitzpatrick, L.R., Small, J., Hoerr, R.A., Bostwick, E.F., Maines, L., and Koltun, W.A. (2008). *In vitro* and *in vivo* effects of the probiotic *Escherichia coli* strain M-17: immunomodulation and attenuation of murine colitis. *Br. J Nutr.* 100, 530-541.
- Flint, H.J., Bayer, E.A., Rincon, M.T., Lamed, R., and White, B.A. (2008). Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Microbiol* 6, 121-131.
- Fogh, J., Wright, W.C., and Loveless, J.D. (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* 58, 209-214.
- Foligne, B., Zoumpopoulou, G., Dewulf, J., Ben, Y.A., Chareyre, F., Sirard, J.C., Pot, B., and Grangette, C. (2007). A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PLoS ONE* 2, e313.
- Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., and Pace, N.R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Nat Acad Sci USA* 104, 13780-13785.
- Freeman, J.M., Plasterer, T.N., Smith, T.F., and Mohr, S.C. (1998). Patterns of Genome Organization in Bacteria. *Science* 279, 1827a.
- Frey, B. and Suppmann, B. (1995). Demonstration of the ExpandTM PCR System's Greater Fidelity and Higher Yields with a *lacI*-based PCR Fidelity Assay. *Biochemica* 2, 8-9.
- Fric, P. (2002). Probiotics in gastroenterology. *Z Gastroenterol* 40, 197-201.
- Gally, D.L., Bogan, J.A., Eisenstein, B.I., and Blomfield, I.C. (1993). Environmental regulation of the *fim* switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: effects of temperature and media. *J Bacteriol* 175, 6186-6193.
- Goios, A., Meirinhos, J., Rocha, R., Lopes, R., Amorim, A., and Pereira, L. (2006). RepeatAround: A software tool for finding and visualizing repeats in circular genomes and its application to a human mtDNA database. *Mitochondrion* 6, 218-224.
- Gotfredsen, M. and Gerdes, K. (1998). The *Escherichia coli relBE* genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. *Mol Microbiol* 29, 1065-1076.
- Grabig, A., Paclik, D., Guzy, C., Dankof, A., Baumgart, D.C., Erckenbrecht, J., Raupach, B., Sonnenborn, U., Eckert, J., Schumann, R.R., Wiedenmann, B., Dignass, A.U., and Sturm, A. (2006). *Escherichia coli* strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways. *Infect Immun* 74, 4075-4082.
- Groisman, E.A. and Ochman, H. (1996). Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* 87, 791-794.
- Grosse, C., Scherer, J., Koch, D., Otto, M., Taudte, N., and Grass, G. (2006). A new ferrous iron-uptake transporter, EfeU (YcdN), from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 62, 120-131.
- Grozdanov, L., Raasch, C., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J., and Dobrindt, U. (2004). Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol* 186, 5432-5441.
- Grozdanov, L., Zahringer, U., Blum-Oehler, G., Brade, L., Henne, A., Knirel, Y.A., Schombel, U., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J., Rietschel, E.T., and Dobrindt, U. (2002). A single nucleotide

- exchange in the *wzy* gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol* 184, 5912-5925.
- Guarner, F. and Schaafsma, G.J. (1998). Probiotics. *Int J Food Microbiol* 39, 237-238.
- Guzy, C., Paclik, D., Schirbel, A., Sonnenborn, U., Wiedenmann, B., and Sturm, A. (2008). The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 induces gamma delta T cell apoptosis via caspase- and FasL-dependent pathways. *Int Immunol* 20, 829-840.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Hochhut, B., and Dobrindt, U. (2003). The molecular basis of infectious diseases: pathogenicity islands and other mobile genetic elements. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* 50, 321-330.
- Hacker, J. and Carniel, E. (2001). Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep* 2, 376-381.
- Hacker, J. and Kaper, J.B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 54, 641-679.
- Hajjar, A.M., Ernst, R.K., Tsai, J.H., Wilson, C.B., and Miller, S.I. (2002). Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat Immunol* 3, 354-359.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hartl, D.L. and Dykhuizen, D.E. (1984). The population genetics of *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* 18, 31-68.
- Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S., Ohtsubo, E., Baba, T., Wanner, B.L., Mori, H., and Horiuchi, T. (2006). Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol Syst Biol* 2, 2006.
- Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C.G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., Tanaka, M., Tobe, T., Iida, T., Takami, H., Honda, T., Sasakawa, C., Ogasawara, N., Yasunaga, T., Kuhara, S., Shiba, T., Hattori, M., and Shinagawa, H. (2001). Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* 8, 11-22.
- Hedin, C., Whelan, K., and Lindsay, J.O. (2007). Evidence for the use of probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: a review of clinical trials. *Proc. Nutr. Soc.* 66, 307-315.
- Helwig, U., Lammers, K.M., Rizzello, F., Brigidi, P., Rohleder, V., Caramelli, E., Gionchetti, P., Schrezenmeir, J., Foelsch, U.R., Schreiber, S., and Campieri, M. (2006). *Lactobacilli*, *bifidobacteria* and *E. coli* Nissle induce pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells. *World J Gastroenterol* 12, 5978-5986.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C., and Dlawer, A. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 692-744.
- Hengge-Aronis, R. (2002). Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 373-95, table.
- Henker, J., Laass, M., Blokhin, B.M., Bolbot, Y.K., Maydannik, V.G., Elze, M., Wolff, C., and Schulze, J. (2007). The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. *Eur J Pediatr* 166, 311-316.

- Henker,J., Laass,M.W., Blokhin,B.M., Maydannik,V.G., Bolbot,Y.K., Elze,M., Wolff,C., Schreiner,A., and Schulze,J. (2008a). Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 versus placebo for treating diarrhea of greater than 4 days duration in infants and toddlers. *Pediatr Infect Dis J* 27, 494-499.
- Henker,J., Muller,S., Laass,M.W., Schreiner,A., and Schulze,J. (2008b). Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) for successful remission maintenance of ulcerative colitis in children and adolescents: an open-label pilot study. *Z Gastroenterol* 46, 874-875.
- Heyland,D.K., Novak,F., Drover,J.W., Jain,M., Su,X., and Suchner,U. (2001). Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence. *JAMA* 286, 944-953.
- Hibi,T. and Ogata,H. (2006). Novel pathophysiological concepts of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 41, 10-16.
- Honeycutt,T.C., El,K.M., Wardrop,R.M., III, Neal-Trice,K., Honeycutt,A.L., Christy,C.G., Mistry,K., Harris,B.D., Meliones,J.N., and Kocis,K.C. (2007). Probiotic administration and the incidence of nosocomial infection in pediatric intensive care: a randomized placebo-controlled trial. *Pediatr Crit Care Med* 8, 452-458.
- Hooper,L.V., Midtvedt,T., and Gordon,J.I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr* 22, 283-307.
- Hooper,L.V., Wong,M.H., Thelin,A., Hansson,L., Falk,P.G., and Gordon,J.I. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 291, 881-884.
- Hopkins,M.J., Sharp,R., and Macfarlane,G.T. (2002). Variation in human intestinal microbiota with age. *Dig Liver Dis* 34 Suppl 2, S12-S18.
- Hudault,S., Guignot,J., and Servin,A.L. (2001). *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut* 49, 47-55.
- Jain,P.K., McNaught,C.E., Anderson,A.D., MacFie,J., and Mitchell,C.J. (2004). Influence of synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium lactis* Bb 12, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and oligofructose on gut barrier function and sepsis in critically ill patients: a randomised controlled trial. *Clin Nutr* 23, 467-475.
- Johnson,J.R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* 4, 80-128.
- Johnson,T.J., Johnson,S.J., and Nolan,L.K. (2006). Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids. *J Bacteriol* 188, 5975-5983.
- Johnson,T.J., Kariyawasam,S., Wannemuehler,Y., Mangiamale,P., Johnson,S.J., Doetkott,C., Skyberg,J.A., Lynne,A.M., Johnson,J.R., and Nolan,L.K. (2007). The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J Bacteriol* 189, 3228-3236.
- Kamada,N., Maeda,K., Inoue,N., Hisamatsu,T., Okamoto,S., Hong,K.S., Yamada,T., Watanabe,N., Tsuchimoto,K., Ogata,H., and Hibi,T. (2008). Nonpathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 inhibits signal transduction in intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 76, 214-220.
- Kaper,J.B., Nataro,J.P., and Mobley,H.L.T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2, 123-140.
- Kelly,D. and Conway,S. (2005). Bacterial modulation of mucosal innate immunity. *Mol Immunol* 42, 895-901.

- King, T., Ishihama, A., Kori, A., and Ferenci, T. (2004). A regulatory trade-off as a source of strain variation in the species *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186, 5614-5620.
- Kleta, S., Steinruck, H., Breves, G., Duncker, S., Laternus, C., Wieler, L.H., and Schierack, P. (2006). Detection and distribution of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 clones in swine herds in Germany. *J Appl Microbiol* 101, 1357-1366.
- Knippers R. (2001). Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag.
- Krammer, H.J., Kamper, H., von, B.R., Zieseniss, E., Stange, C., Schlieger, F., Clever, I., and Schulze, J. (2006). Probiotic drug therapy with *E. coli* strain Nissle 1917 (EcN): results of a prospective study of the records of 3,807 patients. *Z Gastroenterol* 44, 651-656.
- Krogfelt, K.A., Hjulgaard, M., Sorensen, K., Cohen, P.S., and Givskov, M. (2000). *rpoS* gene function is a disadvantage for *Escherichia coli* BJ4 during competitive colonization of the mouse large intestine. *Infect Immun* 68, 2518-2524.
- Kruis, W. (2001). Guidelines of DGVS. Remission. German Society of Digestive and Metabolic Diseases. *Z Gastroenterol* 39, 47-49.
- Kruis, W., Fric, P., Pokrotnieks, J., Lukas, M., Fixa, B., Kascak, M., Kamm, M.A., Weismueller, J., Beglinger, C., Stolte, M., Wolff, C., and Schulze, J. (2004). Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53, 1617-1623.
- Kruis, W., Schutz, E., Fric, P., Fixa, B., Judmaier, G., and Stolte, M. (1997). Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 11, 853-858.
- Kucharzik, T., Maaser, C., Luger, A., Kagnoff, M., Mayer, L., Targan, S., and Domschke, W. (2006). Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies. *Inflamm Bowel Dis* 12, 1068-1083.
- Kuzela, L., Kascak, M., and Vavrecka, A. (2001). Induction and maintenance of remission with nonpathogenic *Escherichia coli* in patients with pouchitis. *Am J Gastroenterol* 96, 3218-3219.
- Lasaro, M.A., Salinger, N., Zhang, J., Wang, Y., Zhong, Z., Goulian, M., and Zhu, J. (2008). F1C fimbriae play an important role in biofilm formation and intestinal colonization of the *Escherichia coli* commensal Nissle 1917. *Appl Environ Microbiol*.
- Lee, J., Mo, J.H., Katakura, K., Alkalay, I., Rucker, A.N., Liu, Y.T., Lee, H.K., Shen, C., Cojocaru, G., Shenouda, S., Kagnoff, M., Eckmann, L., Ben-Neriah, Y., and Raz, E. (2006). Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol* 8, 1327-1336.
- Lievin-Le Moal, V. and Servin, A.L. (2006). The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbiol Rev* 19, 315-337.
- Lilly, D.M. and Stillwell, R.H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147, 747-748.
- Lloyd, A.L., Rasko, D.A., and Mobley, H.L. (2007). Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189, 3532-3546.
- Lobry, J.R. (1996). A simple vectorial representation of DNA sequences for the detection of replication origins in bacteria. *Biochimie* 78, 323-326.

- Lodínová-Zádníková,R., Cukrowska,B., and Tlaskalova-Hogenova,H. (2003). Oral administration of probiotic *Escherichia coli* after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (after 10 and 20 years). *Int Arch Allergy Immunol* 131, 209-211.
- Lodínová-Zádníková,R. and Sonnenborn,U. (1997). Effect of preventive administration of a nonpathogenic *Escherichia coli* strain on the colonization of the intestine with microbial pathogens in newborn infants. *Biol Neonate* 71, 224-232.
- Low,A.S., Dziva,F., Torres,A.G., Martinez,J.L., Rosser,T., Naylor,S., Spears,K., Holden,N., Mahajan,A., Findlay,J., Sales,J., Smith,D.G., Low,J.C., Stevens,M.P., and Gally,D.L. (2006). Cloning, expression, and characterization of fimbrial operon F9 from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 74, 2233-2244.
- Lowe,A.M., Beattie,D.T., and Deresiewicz,R.L. (1998). Identification of novel staphylococcal virulence genes by *in vivo* expression technology. *Mol Microbiol* 27, 967-976.
- Luck,S.N., Turner,S.A., Rajakumar,K., Sakellaris,H., and Adler,B. (2001). Ferric dicitrate transport system (Fec) of *Shigella flexneri* 2a YSH6000 is encoded on a novel pathogenicity island carrying multiple antibiotic resistance genes. *Infect Immun* 69, 6012-6021.
- Ma,H.W., Kumar,B., Ditges,U., Gunzer,F., Buer,J., and Zeng,A.P. (2004). An extended transcriptional regulatory network of *Escherichia coli* and analysis of its hierarchical structure and network motifs. *Nucleic Acids Res* 32, 6643-6649.
- Mack,D.R., Ahrne,S., Hyde,L., Wei,S., and Hollingsworth,M.A. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells *in vitro*. *Gut* 52, 827-833.
- Macpherson,A.J., Geuking,M.B., and McCoy,K.D. (2005). Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria. *Immunology* 115, 153-162.
- Macpherson,A.J. and Uhr,T. (2004). Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303, 1662-1665.
- Madigan,M.T., Martinko J.M., and Parker J. (2001). *Brock Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Madsen,K., Cornish,A., Soper,P., McKaigney,C., Jijon,H., Yachimec,C., Doyle,J., Jewell,L., and De Simone,C. (2001). Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 121, 580-591.
- Makras,L., Falony,G., Van der Meulen,R., and De Vuyst,L. (2006). Production of organic acids from fermentation of mannitol, fructooligosaccharides and inulin by a cholesterol removing *Lactobacillus acidophilus* strain. *J Appl Microbiol* 100, 1388-1389.
- Malchow,H.A. (1997). Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *J Clin Gastroenterol* 25, 653-658.
- Mampel,J., Spirig,T., Weber,S.S., Haagensen,J.A., Molin,S., and Hilbi,H. (2006). Planktonic replication is essential for biofilm formation by *Legionella pneumophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions. *Appl Environ Microbiol* 72, 2885-2895.
- Marrs,C.F., Zhang,L., Tallman,P., Manning,S.D., Somsel,P., Raz,P., Colodner,R., Jantunen,M.E., Siitonen,A., Saxen,H., and Foxman,B. (2002). Variations in 10 putative uropathogen virulence genes among urinary, faecal and peri-urethral *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 51, 138-142.
- McCann,M.L., Abrams,R.S., and Nelson,R.P., Jr. (1994). Recolonization therapy with nonadhesive *Escherichia coli* for treatment of inflammatory bowel disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 730, 243-245.

- McClain, M.S., Blomfield, I.C., Eberhardt, K.J., and Eisenstein, B.I. (1993). Inversion-independent phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175, 4335-4344.
- McCracken, V.J. and Lorenz, R.G. (2001). The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell Microbiol* 3, 1-11.
- Metchnikoff, E. (1907). The prolongation of life. Optimistic studies. London: Butterworth-Heinemann.
- Meyer-Hoffert, U., Hornef, M.W., Henriques-Normark, B., Axelsson, L.G., Midtvedt, T., Putsep, K., and Andersson, M. (2008). Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. *Gut* 57, 764-771.
- Middendorf, B., Hochhut, B., Leipold, K., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., and Hacker, J. (2004). Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. *J Bacteriol* 186, 3086-3096.
- Minamino, T. and Namba, K. (2004). Self-assembly and type III protein export of the bacterial flagellum. *J Mol Microbiol Biotechnol* 7, 5-17.
- Mobley, H.L., Green, D.M., Trifillis, A.L., Johnson, D.E., Chippendale, G.R., Lockatell, C.V., Jones, B.D., and Warren, J.W. (1990). Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect Immun* 58, 1281-1289.
- Mollenbrink, M. and Bruckschen, E. (1994). Treatment of chronic constipation with physiologic *Escherichia coli* bacteria. Results of a clinical study of the effectiveness and tolerance of microbiological therapy with the *E. coli* Nissle 1917 strain (Mutaflor). *Med Klin (Munich)* 89, 587-593.
- Moore, W.E. and Moore, L.H. (1995). Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl Environ Microbiol* 61, 3202-3207.
- Moreno, E., Planells, I., Prats, G., Planes, A.M., Moreno, G., and Andreu, A. (2005). Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 53, 93-99.
- Moritz, R.L. and Welch, R.A. (2006). The *Escherichia coli* *argW-dsdCXA* genetic island is highly variable, and *E. coli* K1 strains commonly possess two copies of *dsdCXA*. *J Clin Microbiol* 44, 4038-4048.
- Mukai, T., Kaneko, S., Matsumoto, M., and Ohori, H. (2004). Binding of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri* to the carbohydrate moieties of intestinal glycolipids recognized by peanut agglutinin. *Int J Food Microbiol* 90, 357-362.
- Mundy, R., MacDonald, T.T., Dougan, G., Frankel, G., and Wiles, S. (2005). *Citrobacter rodentium* of mice and man. *Cell Microbiol* 7, 1697-1706.
- Neumann, E. and Rosenheck, K. (1972). Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J Membr Biol* 10, 279-290.
- Nissle, A. (1918). Die antagonistische Behandlung chronischer Darmstörungen mit Colibakterien. *Med Klinik* 2, 29-30.
- Nougayrede, J.P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U., and Oswald, E. (2006). *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 313, 848-851.
- Nowrouzian, F.L., Wold, A.E., and Adlerberth, I. (2005). *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants. *J Infect Dis* 191, 1078-1083.

- Ochman,H. and Davalos,L.M. (2006). The nature and dynamics of bacterial genomes. *Science* 311, 1730-1733.
- Ochman,H. and Jones,I.B. (2000). Evolutionary dynamics of full genome content in *Escherichia coli*. *EMBO J* 19, 6637-6643.
- Ochman,H., Lawrence,J.G., and Groisman,E.A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405, 299-304.
- Ohnishi,K., Fan,F., Schoenhals,G.J., Kihara,M., and Macnab,R.M. (1997). The FliO, FliP, FliQ, and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*: putative components for flagellar assembly. *J Bacteriol* 179, 6092-6099.
- Pallesen,L., Madsen,O., and Klemm,P. (1989). Regulation of the phase switch controlling expression of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 3, 925-931.
- Parham,N.J., Srinivasan,U., Desvaux,M., Foxman,B., Marrs,C.F., and Henderson,I.R. (2004). PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 230, 73-83.
- Patzer,S.I., Baquero,M.R., Bravo,D., Moreno,F., and Hantke,K. (2003). The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN. *Microbiology* 149, 2557-2570.
- Perna,N.T., Plunkett,G., III, Burland,V., Mau,B., Glasner,J.D., Rose,D.J., Mayhew,G.F., Evans,P.S., Gregor,J., Kirkpatrick,H.A., Posfai,G., Hackett,J., Klink,S., Boutin,A., Shao,Y., Miller,L., Grotbeck,E.J., Davis,N.W., Lim,A., Dimalanta,E.T., Potamouisis,K.D., Apodaca,J., Anantharaman,T.S., Lin,J., Yen,G., Schwartz,D.C., Welch,R.A., and Blattner,F.R. (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409, 529-533.
- Plassmann,D. and Schulte-Witte,H. (2007). Treatment of irritable bowel syndrome with *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN): a retrospective survey. *Med Klin (Munich)* 102, 888-892.
- Posfai,G., Koob,M.D., Kirkpatrick,H.A., and Blattner,F.R. (1997). Versatile insertion plasmids for targeted genome manipulations in bacteria: isolation, deletion, and rescue of the pathogenicity island LEE of the *Escherichia coli* O157:H7 genome. *J Bacteriol* 179, 4426-4428.
- Pukatzki,S., Ma,A.T., Revel,A.T., Sturtevant,D., and Mekalanos,J.J. (2007). Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Nat Acad Sci USA* 104, 15508-15513.
- Rakin,A., Noelting,C., Schubert,S., and Heesemann,J. (1999). Common and specific characteristics of the high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 67, 5265-5274.
- Reissbrodt,R., Hammes,W.P., Dal,B.F., Prager,R., Fruth,A., Hantke,K., Rakin,A., Starcic-Erjavec,M., and Williams,P.H. (2009). Inhibition of growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by nonpathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 290, 62-69.
- Rembacken,B.J., Snelling,A.M., Hawkey,P.M., Chalmers,D.M., and Axon,A.T. (1999). Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 354, 635-639.
- Resta-Lenert,S. and Barrett,K.E. (2003). Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* 52, 988-997.

- Restieri, C., Garriss, G., Locas, M.C., and Dozois, C.M. (2007). Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Appl Environ Microbiol* 73, 1553-1562.
- Riley, M.A. and Wertz, J.E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol* 56, 117-137.
- Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J., Fakhr, M.K., and Nolan, L.K. (2005). Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology* 151, 2097-2110.
- Roesch, P.L., Redford, P., Batchelet, S., Moritz, R.L., Pellett, S., Haugen, B.J., Blattner, F.R., and Welch, R.A. (2003). Uropathogenic *Escherichia coli* use D-serine deaminase to modulate infection of the murine urinary tract. *Mol Microbiol* 49, 55-67.
- Rohrbach, M.R., Braun, V., and Koster, W. (1995). Ferrichrome transport in *Escherichia coli* K-12: altered substrate specificity of mutated periplasmic FhuD and interaction of FhuD with the integral membrane protein FhuB. *J Bacteriol* 177, 7186-7193.
- Rollenhagen, C., Sorensen, M., Rizos, K., Hurvitz, R., and Bumann, D. (2004). Antigen selection based on expression levels during infection facilitates vaccine development for an intracellular pathogen. *Proc Nat Acad Sci USA* 101, 8739-8744.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Samuel, B.S., Shaito, A., Motoike, T., Rey, F.E., Backhed, F., Manchester, J.K., Hammer, R.E., Williams, S.C., Crowley, J., Yanagisawa, M., and Gordon, J.I. (2008). Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Nat Acad Sci USA* 105, 16767-16772.
- Sandborn, W.J. (2008). Current directions in IBD therapy: what goals are feasible with biological modifiers? *Gastroenterology* 135, 1442-1447.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA* 74, 5463-5467.
- Sartor, R.B. (2005). Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. *Curr Opin Gastroenterol* 21, 44-50.
- Sartor, R.B. (2008). Therapeutic correction of bacterial dysbiosis discovered by molecular techniques. *Proc Nat Acad Sci USA* 105, 16413-16414.
- Schlee, M., Harder, J., Koten, B., Stange, E.F., Wehkamp, J., and Fellermann, K. (2008). Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte beta-defensin 2. *Clin Exp Immunol* 151, 528-535.
- Schlee, M., Wehkamp, J., Altenhoefer, A., Oelschlaeger, T.A., Stange, E.F., and Fellermann, K. (2007). Induction of human {beta}-Defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect Immun* 75, 2399-2407.
- Schrezenmeir, J. and de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 73, 361S-364S.
- Schubert, S., Rakin, A., and Heesemann, J. (2004). The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int J Med Microbiol* 294, 83-94.

- Schulze,J., Schiemann,M., and Sonnenborn,U. (2006). 120 Jahre *E. coli*. Bedeutung in Forschung und Medizin. ANG Alfred Nissle Gesellschaft).
- Schwan,W.R., Lee,J.L., Lenard,F.A., Matthews,B.T., and Beck,M.T. (2002). Osmolarity and pH growth conditions regulate *fim* gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun 70, 1391-1402.
- Segarra-Newnham,M. (2007). Probiotics for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: focus on *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii*. Ann Pharmacother 41, 1212-1221.
- Seksik,P., Rigottier-Gois,L., Gramet,G., Sutren,M., Pochart,P., Marteau,P., Jian,R., and Dore,J. (2003). Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. Gut 52, 237-242.
- Senok,A.C., Ismaeel,A.Y., and Botta,G.A. (2005). Probiotics: facts and myths. Clin Microbiol Infect 11, 958-966.
- Servin,A.L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiol Rev 28, 405-440.
- Simon,R., Priefer,U., and Pühler,A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. Nature Biotechnology 1, 784-791.
- Singhi,S. (2007). Probiotics in the critically ill: handle with care! Pediatr Crit Care Med 8, 499-501.
- Skyberg,J.A., Johnson,T.J., Johnson,J.R., Clabots,C., Logue,C.M., and Nolan,L.K. (2006). Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. Infect Immun 74, 6287-6292.
- Snyder,J.A., Haugen,B.J., Buckles,E.L., Lockatell,C.V., Johnson,D.E., Donnenberg,M.S., Welch,R.A., and Mobley,H.L. (2004). Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. Infect Immun 72, 6373-6381.
- Sollid,L.M. and Johansen,F.E. (2008). Animal models of inflammatory bowel disease at the dawn of the new genetics era. PLoS Med. 5, e198.
- Sonnenborn,U., Schiemann,M., and Müller,H. (2008). Neue Forschungsergebnisse zu den Wirkmechanismen von *E. coli* Stamm Nissle 1917 (Mutaflor(R)). ANG Alfred Nissle Gesellschaft).
- Sonnenburg,J.L., Chen,C.T., and Gordon,J.I. (2006). Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host. PLoS Biol 4, e413.
- Sorensen,M., Lippuner,C., Kaiser,T., Misslitz,A., Aebischer,T., and Bumann,D. (2003). Rapidly maturing red fluorescent protein variants with strongly enhanced brightness in bacteria. FEBS Lett 552, 110-114.
- Stappenbeck,T.S., Hooper,L.V., and Gordon,J.I. (2002). Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. Proc Nat Acad Sci USA 99, 15451-15455.
- Stentebjerg-Olesen,B., Chakraborty,T., and Klemm,P. (1999). Type 1 fimbriation and phase switching in a natural *Escherichia coli* *fimB* null strain, Nissle 1917. J Bacteriol 181, 7470-7478.
- Sturm,A., Rilling,K., Baumgart,D.C., Gargas,K., bou-Ghazale,T., Raupach,B., Eckert,J., Schumann,R.R., Enders,C., Sonnenborn,U., Wiedenmann,B., and Dignass,A.U. (2005). *Escherichia coli* Nissle 1917 distinctively modulates T-cell cycling and expansion via toll-like receptor 2 signaling. Infect Immun 73, 1452-1465.

- Sun,J., Gunzer,F., Westendorf,A.M., Buer,J., Scharfe,M., Jarek,M., Gossling,F., Blocker,H., and Zeng,A.P. (2005). Genomic peculiarity of coding sequences and metabolic potential of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 inferred from raw genome data. *J Biotechnol* 117, 147-161.
- Sun,J., Le,G.W., Shi,Y.H., and Su,G.W. (2007). Factors involved in binding of *Lactobacillus plantarum* Lp6 to rat small intestinal mucus. *Lett Appl Microbiol* 44, 79-85.
- Sun,J. and Zeng,A.P. (2004). IdentiCS-identification of coding sequence and in silico reconstruction of the metabolic network directly from unannotated low-coverage bacterial genome sequence. *BMC Bioinformatics* 5, 112.
- Swidsinski,A., Loening-Baucke,V., Theissig,F., Engelhardt,H., Bengmark,S., Koch,S., Lochs,H., and Dorffel,Y. (2007). Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut* 56, 343-350.
- Tamboli,C.P., Neut,C., Desreumaux,P., and Colombel,J.F. (2004). Dysbiosis as a prerequisite for IBD. *Gut* 53, 1057.
- Tancrede,C. (1992). Role of human microflora in health and disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11, 1012-1015.
- Tettelin,H., Massignani,V., Cieslewicz,M.J., Donati,C., Medini,D., Ward,N.L., Angiuoli,S.V., Crabtree,J., Jones,A.L., Durkin,A.S., Deboy,R.T., Davidsen,T.M., Mora,M., Scarselli,M., Ros,I., Peterson,J.D., Hauser,C.R., Sundaram,J.P., Nelson,W.C., Madupu,R., Brinkac,L.M., Dodson,R.J., Rosovitz,M.J., Sullivan,S.A., Daugherty,S.C., Haft,D.H., Selengut,J., Gwinn,M.L., Zhou,L., Zafar,N., Khouri,H., Radune,D., Dimitrov,G., Watkins,K., O'Connor,K.J., Smith,S., Utterback,T.R., White,O., Rubens,C.E., Grandi,G., Madoff,L.C., Kasper,D.L., Telford,J.L., Wessels,M.R., Rappuoli,R., and Fraser,C.M. (2005). Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". *Proc Nat Acad Sci USA* 102, 13950-13955.
- Theodoropoulos,C., Wong,T.H., O'Brien,M., and Stenzel,D. (2001). *Plesiomonas shigelloides* enters polarized human intestinal Caco-2 cells in an *in vitro* model system. *Infect Immun* 69, 2260-2269.
- Todorov,S.D., Botes,M., Danova,S.T., and Dicks,L.M. (2007). Probiotic properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* HV219, isolated from human vaginal secretions. *J Appl Microbiol* 103, 629-639.
- Tong,J.L., Ran,Z.H., Shen,J., Zhang,C.X., and Xiao,S.D. (2007). Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 25, 155-168.
- Ukena,S.N., Singh,A., Dringenberg,U., Engelhardt,R., Seidler,U., Hansen,W., Bleich,A., Bruder,D., Franzke,A., Rogler,G., Suerbaum,S., Buer,J., Gunzer,F., and Westendorf,A.M. (2007). Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS ONE* 2, e1308.
- Ukena,S.N., Westendorf,A.M., Hansen,W., Rohde,M., Geffers,R., Coldewey,S., Suerbaum,S., Buer,J., and Gunzer,F. (2005). The host response to the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917: specific up-regulation of the proinflammatory chemokine MCP-1. *BMC Med Genet* 6, 43.
- Ulett,G.C., Mabbett,A.N., Fung,K.C., Webb,R.I., and Schembri,M.A. (2007a). The role of F9 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* in biofilm formation. *Microbiology* 153, 2321-2331.
- Ulett,G.C., Valle,J., Beloin,C., Sherlock,O., Ghigo,J.M., and Schembri,M.A. (2007b). Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract. *Infect Immun* 75, 3233-3244.
- Vanderpool,C., Yan,F., and Polk,D.B. (2008). Mechanisms of probiotic action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 14, 1585-1596.

- Waring,M.J. (1965). Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol* 13, 269-282.
- Weber,H., Polen,T., Heuveling,J., Wendisch,V.F., and Hengge,R. (2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol* 187, 1591-1603.
- Wehkamp,J., Harder,J., Wehkamp,K., Wehkamp-von Meissner,B., Schlee,M., Enders,C., Sonnenborn,U., Nuding,S., Bengmark,S., Fellermann,K., Schroder,J.M., and Stange,E.F. (2004). NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun* 72, 5750-5758.
- Wehkamp,J., Schmid,M., Fellermann,K., and Stange,E.F. (2005). Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease. *J Leukoc Biol* 77, 460-465.
- Welch,R.A., Burland,V., Plunkett,G.I., Redford,P., Roesch,P., Rasko,D., Buckles,E.L., Liou,S.R., Boutin,A., Hackett,J., Stroud,D., Mayhew,G.F., Rose,D.J., Zhou,S., Schwartz,D.C., Perna,N.T., Mobley,H.L., Donnenberg,M.S., and Blattner,F.R. (2002). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Nat Acad Sci USA* 99, 17020-17024.
- Westendorf,A.M., Gunzer,F., Deppenmeier,S., Tapadar,D., Hunger,J.K., Schmidt,M.A., Buer,J., and Bruder,D. (2005). Intestinal immunity of *Escherichia coli* Nissle 1917: a safe carrier for therapeutic molecules. *FEMS Immunol Med Microbiol* 43, 373-384.
- Wiles,S., Clare,S., Harker,J., Huett,A., Young,D., Dougan,G., and Frankel,G. (2004). Organ specificity, colonization and clearance dynamics *in vivo* following oral challenges with the murine pathogen *Citrobacter rodentium*. *Cell Microbiol* 6, 963-972.
- Wiles,S., Pickard,K.M., Peng,K., MacDonald,T.T., and Frankel,G. (2006). *In vivo* bioluminescence imaging of the murine pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun* 74, 5391-5396.
- Wiles,T.J., Kulesus,R.R., and Mulvey,M.A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* 85, 11-19.
- Winson,M.K., Swift,S., Hill,P.J., Sims,C.M., Griesmayr,G., Bycroft,B.W., Williams,P., and Stewart,G.S. (1998). Engineering the *luxCDABE* genes from *Photobacterium luminescens* to provide a bioluminescent reporter for constitutive and promoter probe plasmids and mini-Tn5 constructs. *FEMS Microbiol Lett* 163, 193-202.
- Yanisch-Perron,C., Vieira,J., and Messing,J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.
- Yoon,J.W. and Hovde,C.J. (2008). All blood, No stool: enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *J Vet Sci* 9, 219-231.
- Zdziarski,J., Svanborg,C., Wullt,B., Hacker,J., and Dobrindt,U. (2008). Molecular basis of commensalism in the urinary tract: low virulence or virulence attenuation? *Infect Immun* 76, 695-703.
- Zyrek,A.A., Cichon,C., Helms,S., Enders,C., Sonnenborn,U., and Schmidt,M.A. (2007). Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCzeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell Microbiol* 9, 804-816.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

A _{260nm}	Absorption bei 260 nm	l	Liter
a. dest	destilliertes Wasser	LB	Lysogeny broth
AIEC	Adhärenz-invasiver <i>E. coli</i>	LPS	Lipopolysaccharid
Amp	Ampicillin	LSM	Laser Scan Microscope
APEC	Avian pathogener <i>E. coli</i>	Km	Kanamycin
ATP	Adenosintriphosphat	M	Molar
bp	Basenpaare	MC	Morbus Crohn
BSA	Bovine serum albumine	MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1-ligand-2
cDNA	complementary DNA	MCS	Multiple cloning site
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankung	MDS	Multiple deletion strain
Cm	Chloramphenicol	mg	Milligramm
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	min	Minuten
CU	Colitis ulcerosa	MIP-2α	Macrophage inflammatory protein-2 alpha
DAEC	Diffus-adhärenz <i>E. coli</i>	MIP-2β	Macrophage inflammatory protein-2 beta
DAPI	4'-6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid	ml	Milliliter
DC	Dendritische Zellen	mM	Millimolar
dNTP	Desoxyribonukleotide	MMLV-RT	Murine Leukemia Virus – Reverse Transkriptase
ddNTP	Didesoxynukleotide	MOI	Multiplicity of infection
DMSO	Dimethylsulfoxid	MOPS	3-N-Morpholino-propansulfonsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure	mRNA	messenger Ribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease	μg	Mikrogramm
dNTPs	Desoxyribonukleinsäure-triphosphat	μl	Mikroliter
EcN	<i>E. coli</i> Nissle 1917	μm	Mikrometer
EcNDS	<i>E. coli</i> Nissle 1917 Deletion Strain	ND	Nissle deletion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	NFκB	Nuclear Factor kappa B
EAEC	Enteropathogener <i>E. coli</i>	ng	Nanogramm
EHEC	Enterohämorrhagischer <i>E. coli</i>	nm	Nanometer
EIEC	Enteroinvasiver <i>E. coli</i>	OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600nm
EPEC	Enteropathogener <i>E. coli</i>	ori	Replikationsursprung
et al.	et alii	PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
EtBr	Ethidiumbromid	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ETEC	Enterotoxischer <i>E. coli</i>	pH	potentia hydrogenii
EtOH	Ethanol	qRT-PCR	quantitative Realtime PCR
ExPEC	Extraintestinal pathogener <i>E. coli</i>	RNA	Ribonukleinsäure
FACS	Fluorescence activated cell sorter	rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
FCS	Fetales Kälberserum	Rnase	Ribonuklease
g	Gramm; Erdbeschleunigung	rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
GEI, GI	Genomische Insel	RT	Raumtemperatur
Gm	Gentamicin	s	Sekunde
h	Stunde	SAP	Shrimp alkaline phosphatase
HGT	Horizontaler Gentransfer	SDS	Natriumdodecylsulfat
IL	Interleukin	SSC	Natriumchlorid-Citrat-Lösung (Saline Sodium Citrate)
IS	Insertionssequenz	T _a	Anlagerungstemperatur
kb	Kilobasenpaare		
KbE	Kolonie bildende Einheit		

T _m	Schmelztemperatur	Tween-20	Poly-(oxyethylen)-sorbitat-
TBE	Tris-Borat-EDTA		monolaurat
TE	Tris-EDTA	U	Units
TLR	Toll-like Receptor	ÜN	über Nacht
Tris	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan	UV	Ultraviolett
		V	Volt
Triton	t-Octoylphenoxy- polyethoxyethanol	W	Watt
		ZO	Zonula occludens

8.2 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Beschreibung/Anwendung
Allgemeine Oligonukleotide		
amp 1	CATCCAGTCTATTAATTGTTGC	Vektorprimer pST76-A in <i>bla</i>
amp 2	GGCTGGCTGGTTTATTGC	Vektorprimer pST76-A in <i>bla</i>
BR322-1	AATAGGCGTATCACGAGG	Vektorprimer pBR322
BR322-2	TGTTAGATTTTCATACACG	Vektorprimer pBR322
M13rev	GAGCGGATAACAATTTACAC	Vektorprimer pUC19
M13uni	AGGGTTTCCCAGTCACGACG	Vektorprimer pUC19
EcN-spezifische Oligonukleotide		
Muta 5	AACTGTGAAGCGATGAACCC	pMUT1, Amplifikation (mit Muta 6→360bp)
Muta 6	GGACTGTCAGAGAGCTATC	pMUT1, Amplifikation (mit Muta 5→360bp)
Muta 7	GACCAAGCGATAACCGGATG	pMUT2, Amplifikation (mit Muta 8→420bp)
Muta 8	GTGAGATGATGGCCACGATT	pMUT2, Amplifikation (mit Muta 7→420bp)
Muta 8a	GCTCTAGAGTGAGATGATGGC CACGATT	EcN pMUT2 mit <i>Xba</i> I-Site, Plasmid
Muta 10a	CCGAGCTCCGGCGTATCGATA ATTCACG	EcN pMUT2 mit <i>Sac</i> I-Site, Deletion von pMUT2
Muta 11	GCTCTAGAGCGATAACTTTAAC TGTGAAGCG	EcN pMUT1 mit <i>Xba</i> I-Site, Deletion von pMUT1
Muta 12	CCGAGCTCCCGTATCTAATTCT GGCAGG	EcN pMUT1 mit <i>Sac</i> I-Site, Deletion von pMUT1
Amplifikation und Sequenzierung von <i>rpoS</i> aus EcN und <i>E. coli</i> CFT073		
RpoS1	GCTCTAGATACGCCATAACG ACACAATG	Amplifikation von <i>rpoS</i> mit <i>Xba</i> I-Site mit RpoS23 für Genaustausch
RpoS8	CCCAAGCTTCGACGCAGCAGA GCAAGGAGTT	Amplifikation von <i>rpoS</i> mit Promotor in <i>nlpD</i> und <i>Hind</i> III-Site mit RpoS22
RpoS22	CCCAAGCTTGCCAAATGTGAC GCTGACGCG	Amplifikation von <i>rpoS</i> mit <i>Hind</i> III-Site mit RpoS8
RpoS23	CCGAGCTCGCGATAACAGTTC AACATGTACC	Amplifikation von <i>rpoS</i> mit <i>Sac</i> I-Site mit RpoS1 für Genaustausch
Nachsequenzierung des Yersiniabactin-Genclusters in <i>E. coli</i> CFT073		
CFT ybt 1	GAGTAGAGAATAAGATAGC	Yersiniabactin in <i>E. coli</i> CFT073
CFT ybt 2	CGCTGAATTACCGCAAAC	Yersiniabactin in <i>E. coli</i> CFT073
CFT ybt 3	GCTGGCTATCCAGTATGC	Yersiniabactin in <i>E. coli</i> CFT073
CFT ybt 4	CCAACAACGGTACGCAAC	Yersiniabactin in <i>E. coli</i> CFT073
CFT ybt 5	CCAGTTGATAAGAGTTGC	Yersiniabactin in <i>E. coli</i> CFT073
CFT ybt 6	GCTGAAGCGTCGTCATACC	Yersiniabactin in <i>E. coli</i> CFT073
Narbenlose Deletionen ausgewählter genomischer Regionen in EcN		
GE1pIA	CGGAATTCAACTGGAGGATGCC AGA	Amplifikation EcN GE1 Block A, <i>Eco</i> RI-Site
GE1pIBR	GAAGAGAATATCATGACATGCT GGCAGTATAGCT	Amplifikation EcN GE1 Block A, Überhang Block B
GE1pIBF	CAGCATGTCATGATATTCTCTTC ATACATCA	Amplifikation EcN GE1 Block B, Überhang Block A
GE1pIC	CGGGATCCGACGCTTCAGGTGA GA	Amplifikation EcN GE1 Block B, <i>Bam</i> HI-Site
GE1pID	CGAACACCGCTTTAAGATC	EcN GE1 Block AB flankierend, Amplifikation und Sequenzierung
GE1pIE	ACGAAAGGACTTACTATGAG	EcN GE1 Block AB flankierend, Amplifikation und Sequenzierung

GE1pIF	CCACCGGGTATGCCATC	EcN GE1 Block AB flankierend, Sequenzierung GE1-Deletion
GE1pIG	GCCCCGATAAACAAAGCGTTATCG	EcN GE1 Block AB flankierend, Sequenzierung GE1-Deletion
GE2pIA	CGGAATTCTACTGAGGGATGGT GTT	Amplifikation EcN GE2 Block A, <i>EcoRI</i> - Site
GE2pIBR	AGGCTGAACTTTGATGATGTGAT CCTAATCT	Amplifikation EcN GE2 Block A, Überhang BlockB
GE2pIBF	ATCATCAAAGTTTCAGCCTTCTGA ATGCGT	Amplifikation EcN GE2 Block B, Überhang BlockA
GE2pIC	CGGGATCCGTCGATGATGGCAG ACT	Amplifikation EcN GE2 Block B, <i>BamHI</i> - Site
GE2pID	TCCAGTGAAACTATTCGTC	EcN GE2 Block AB flankierend, Amplifikation und Sequenzierung
GE2pIE	TGATCATCCAGTTAACACT	EcN GE2 Block AB flankierend, Amplifikation und Sequenzierung
GE2pIF	GGATTAGAAGAAACGAGAC	EcN GE2 Block AB flankierend, Sequenzierung GE2-Deletion
GE2pIG	CATTGTGTGGGTATAATTGC	EcN GE2 Block AB flankierend, Sequenzierung GE2-Deletion
pks pID	GGAGACCGGAATTCGGAAAGG GACATGATGCGTCGTGTAAATA TTCTTTG	Amplifikation EcN pks Block A, <i>EcoRI</i> -Site
pks pIE	GGGTGGGCATCGCTAATATTCG CCTCAGTCAGAGGAGCCAAATT CAAAAA	Amplifikation von pks Block A, Überhang Block B
pks pIF	TTTTTGAATTTGGCTCCTCTGAC TGAGGCGAATATTAGCGATGCC CACCC	Amplifikation von pks Block B, Überhang Block A
pks pIG	ATCCCTAGCGCATGCCCCGCTAC TGATTAACGGTAGCCTGAATATT CTTAA	Amplifikation von pks Block B, <i>SphI</i> -Site
pks H	CAATATGGATATGCGTTTAGG	EcN pks Block AB flankierend, Amplifikation und Sequenzierung
pks I	CAACGCTAATTCATCATTTTGG	EcN pks Block AB flankierend, Amplifikation und Sequenzierung
pks J	CAGGCTGGGCGAGAAAC	Sequenzierung EcN pks-Deletion
pks K	GGGAATGCCTGTGCAAATTAG	Sequenzierung EcN pks-Deletion
pks L	CGTTCTCAATTGCGGCTC	Sequenzierung EcN pks-Deletion
pks M	CCTCGATCCGAGCCG	Sequenzierung EcN pks-Deletion
Promotorbank von EcN und Promotor-<i>lux</i>-Konstrukte		
pMW82-1	CGATGCGTCCGGCGTAGA	Vektorprimer pMW82
pMW82-2	TATCTCCTTCTTAAATCTAGA	Vektorprimer pMW82
pMW82-2a	TGTATATCTCCTTCTTAAATCTA GA	Vektorprimer pMW82-2 plus 4 nt
pMW82-3	GCAAGGAATGGTGCATGCAA	Vektorprimer pMW82 ca. 200bp entfernt von <i>BamHI</i>
pMW82-4	GCCATGGAACAGGTAGTTTTC	Vektorprimer pMW82 ca. 200bp entfernt von <i>BamHI</i>
pMW82-5	CACCGGAAGGAGCTGAC	Vektorprimer pMW82
P1F	CCGTCGACTTGCCAGCCGCTTA AAAG	Amplifikation des <i>gyrB</i> -Promotors in EcN, <i>SalI</i> -Site
P1R	ATTTTTTTAGTCATCAACGTTTC TCGCTCATTTA	Amplifikation des <i>gyrB</i> -Promotors in EcN, Überhang <i>luxC</i> für Fusion

P1-luxC	CGAGAAACGTTGATGACTAAAA AAATTTTCATTTCATT	Amplifikation des <i>luxC</i> , Überhang P1 für Fusion
P2F	CCG T CGACAAAACGACTCCTCG TAGAG	Amplifikation des <i>malI</i> -Promotors in EcN, <i>Sall</i> -Site
P2R	AATTTTTTTAGTCATGCAGATGA CCTACTCCC	Amplifikation des <i>malI</i> -Promotors in EcN, Überhang <i>luxC</i> für Fusion
P2-luxC	GTAGGTCATCTGCATGACTAAA AAAATTTTCATTTCATT	Amplifikation des <i>luxC</i> , Überhang P2 für Fusion
P3F	CCG T CGACGCAGATGACCTACT CCCT	Amplifikation des <i>malX</i> -Promotors in EcN, <i>Sall</i> -Site
P3R	ATTTTTTTTAGTCATAAAACGACT CCTCGTAGAG	Amplifikation des <i>malX</i> -Promotors in EcN, Überhang <i>luxC</i> für Fusion
P3-luxC	GAGGAGTCGTTTTATGACTAAA AAAATTTTCATTTCATT	Amplifikation des <i>luxC</i> , Überhang P3 für Fusion
P4F	CGAGAGTAG T CGACCATGGCGA TGCAAATGGC	Amplifikation des <i>selD</i> -Promotors in EcN, <i>Sall</i> -Site
P4Fb	CGAGAGTAG T CGACCATGAGCG AGAACTCGATTTC	Amplifikation des <i>selD</i> -Promotors Teil b in EcN, <i>Sall</i> -Site
P4R	ATTTTTTTAGTCATGCCCATAGC AAAGATATC	Amplifikation des <i>selD</i> -Promotors in EcN, Überhang <i>luxC</i> für Fusion
P4-luxCa	GACAGGAGATGTCCATGACTAA AAAAATTTTCATTCA	Amplifikation des <i>luxC</i> , Überhang P4a für Fusion
P4Ra	ATTTTTTTAGTCATGGACATCTC CTGTCAATG	Amplifikation des <i>selD</i> -Promotors Teil a in EcN, Überhang <i>luxC</i> für Fusion
P4-luxC	CTTTGCTATGGGCATGACTAAAA AAATTTTCATTCA	Amplifikation des <i>luxC</i> , Überhang P4 und P4b für Fusion
P5F	CGAGAGTAG T CGACATGAAGA AGCCTCTGGTT	Amplifikation des Promotors ECN3894-96 in EcN, <i>Sall</i> -Site
P5R	ATTTTTTTAGTCATGTCCGATAT ATTTTGCATG	Amplifikation des Promotors ECN3894-96 in EcN, <i>luxC</i> -Überhang
P5-luxC	GCAAAATATATCGGACATGACT AAAAAAATTTTCATTCA	Amplifikation des <i>luxC</i> , Überhang P5 für Fusion

Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind fett gedruckt.

8.3 EcN-spezifische Gene

No.	Locus tag	Description			
1	ECN0044	hypothetical protein	36	ECN1808	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
2	ECN0045	hypothetical protein	37	ECN1941	conserved hypothetical protein
3	ECN0046	putative ATP-binding protein	38	ECN1942	Transposase
4	ECN0048	conserved hypothetical protein YfjZ.	39	ECN2067	hypothetical protein
5	ECN0052	hypothetical protein	40	ECN2087	hypothetical protein
6	ECN0053	conserved hypothetical protein YfjJ	41	ECN2187	phage endodeoxyribonuclease
7	ECN0054	putative regulatory protein	42	ECN2190	hypothetical protein
8	ECN0055	putative secreted protein	43	ECN2191	hypothetical protein
9	ECN0056	putative GTPase	44	ECN2192	hypothetical protein
10	ECN0057	Putative HTH-type transcriptional regulator	45	ECN2194	putative exonuclease
11	ECN0058	hypothetical protein	46	ECN2195	hypothetical protein
12	ECN0059	hypothetical protein	47	ECN2196	hypothetical protein
13	ECN0060	hypothetical protein	48	ECN2197	hypothetical protein
14	ECN0061	hypothetical protein	49	ECN2198	hypothetical protein
15	ECN0062	hypothetical protein	50	ECN2200	putative phage methyltransferase
16	ECN0864	K5 capsule biosynthesis protein	51	ECN2205	conserved hypothetical protein
17	ECN0865	K5 capsule biosynthesis protein	52	ECN2207	hypothetical protein
18	ECN0866	hypothetical protein	53	ECN2210	hypothetical phage-related protein
19	ECN0867	putative glycosyltransferase	54	ECN2222	phage major tail protein V
20	ECN0868	UDP-glucose 6-dehydrogenase	55	ECN2223	phage minor tail protein G
21	ECN0890	conserved hypothetical protein	56	ECN2224	hypothetical protein
22	ECN0915	putative GntR-family transcriptional regulator protein	57	ECN2225	phage-related minor tail protein
23	ECN0924	hypothetical protein	58	ECN2226	phage minor tail protein
24	ECN0925	hypothetical protein	59	ECN2227	phage minor tail protein
25	ECN0926	putative secreted protein	60	ECN2228	conserved phage protein
26	ECN0927	putative transposase, IS150 ORF B	61	ECN2229	phage tail assembly protein
27	ECN0928	hypothetical protein	62	ECN2230	putative phage tail protein
28	ECN0929	hypothetical protein	63	ECN2231	putative secreted protein
29	ECN0957	hypothetical protein	64	ECN2235	conserved phage protein
30	ECN1164	Transposase	65	ECN2236	conserved phage protein
31	ECN1733	conserved hypothetical protein	66	ECN2237	hypothetical protein
32	ECN1735	Terminase small subunit Nu1	67	ECN2238	hypothetical protein
33	ECN1750	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica	68	ECN2531	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
34	ECN1751	Hypothetical protein	69	ECN2598	hypothetical protein
35	ECN1752	Hypothetical protein	70	ECN2943	hypothetical protein
			71	ECN2969	putative phage transposase/integrase
			72	ECN3001	hypothetical protein
			73	ECN3053	hypothetical protein
			74	ECN3091	hypothetical protein
			75	ECN3141	hypothetical protein

76	ECN3171	hypothetical protein			
77	ECN3201	hypothetical protein	111	ECN4452	methyltransferase
78	ECN3461	hypothetical protein			conserved hypothetical
79	ECN3730	hypothetical protein	112	ECN4453	protein
80	ECN3882	hypothetical protein	113	ECN4467	hypothetical protein
81	ECN3921	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica			putative hemolysin
82	ECN3963	hypothetical protein	114	ECN4476	expression modulating
83	ECN3967	P pili regulatory PapB family protein	115	ECN4489	protein
84	ECN3971	hypothetical protein			IS1 transposase fragment
85	ECN3975	P pili regulatory PapB family protein	116	ECN4490	transposase IS3/IS911
86	ECN3976	hypothetical protein			family protein (fragment)
87	ECN3979	hypothetical protein			transposase for insertion
88	ECN3980	hypothetical protein			sequence element
89	ECN3992	putative transposase	117	ECN4492	IS30B/C/D
90	ECN4004	putative oligogalacturonide transporter fragment	118	ECN4493	hypothetical protein
91	ECN4006	putative pectin degradation protein	119	ECN4496	hypothetical protein
92	ECN4061	hypothetical protein	120	ECN4914	hypothetical protein
93	ECN4187	hypothetical protein	121	ECN4963	transposase
94	ECN4195	putative secreted protein			
95	ECN4366	hypothetical protein			
96	ECN4378	conserved hypothetical protein			
97	ECN4379	type I restriction- modification system DNA methylase			
98	ECN4380	putative type I restriction- modification system specificity protein			
99	ECN4381	type I site specific deoxyribonuclease			
100	ECN4386	hypothetical protein			
101	ECN4415	conserved hypothetical protein			
102	ECN4416	transposase			
103	ECN4440	putative membrane protein			
104	ECN4441	L-ribulose-5-phosphate 4- epimerase / L-fucose-1- phosphate aldolase			
105	ECN4442	putative translation initiation factor eIF-2B alpha subunit / 5- methylthioribose-1- phosphate isomerase			
106	ECN4443	putative 5- methylthioribose kinase			
107	ECN4447	hypothetical protein			
108	ECN4449	restriction endonuclease			
109	ECN4450	putative N5 cytosine DNA methyltransferase			
110	ECN4451	putative N6 adenine DNA			

8.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. 1 Die Mikroflora des humanen Gastrointestinaltrakts	1
Abbildung 1. 2 Zusammenspiel verschiedener Faktoren in der CED-Pathogenese.....	9
Abbildung 1. 3 Wirkungen probiotischer Bakterien auf den Wirt.....	14
Abbildung 1. 4 Strukturkomponenten und Fitnessfaktoren von EcN	18
Abbildung 3. 1 Generierung eines Fusionsproduktes aus zwei PCR-Produkten	32
Abbildung 3. 2 Erzeugung von Mutationen durch homologe Rekombination mit einem Suizidvektor	43
Abbildung 3. 3 Schematische Darstellung einer narbenlosen Deletion (Scarless Engineering)	45
Abbildung 3. 4 Konstruktion einer Promotorbank.....	52
Abbildung 3. 5 Identifizierung von intestinal <i>in vivo</i> regulierten Genen mit der Promotorbank von EcN	53
Abbildung 4. 1 Zirkuläre Darstellung des Genoms von EcN	60
Abbildung 4. 2 Grafische Darstellung der stammspezifischen Plasmide von EcN.....	61
Abbildung 4. 3 Entwicklung der Kerngenomgröße und der Anzahl EcN-spezifischer Gene	66
Abbildung 4. 4 Genvergleich von EcN und <i>E. coli</i> CFT073 im Bereich der GI _{EcN} II	69
Abbildung 4. 5 Die genetisch variable Region <i>dsdCX- argW</i> in <i>E. coli</i>	72
Abbildung 4. 6 Phylogenie von 14 <i>E. coli</i> -Genomen	73
Abbildung 4. 7 Homologievergleich der Genome von EcN und <i>E. coli</i> CFT073.....	74
Abbildung 4. 8 Deletion im Bereich der Gene <i>yedQ</i> und <i>fliR</i> in EcN	80
Abbildung 4. 9 <i>rpoS</i> -Sequenzen von EcN und <i>E. coli</i> CFT073.....	83
Abbildung 4. 10 Korrelation von Säureresistenz und <i>rpoS</i> -Genotyp verschiedener <i>E. coli</i>	84
Abbildung 4. 11 Korrelation von Säureresistenz und <i>rpoS</i> -Genotyp nach Säureadaptation.....	86
Abbildung 4. 12 Regulation von MCP-1 und ZO-1 in Lovo-Zellen nach Co-Kultur mit <i>E. coli</i>	89
Abbildung 4. 13 Einfluss verschiedener <i>E. coli</i> auf die Adhärenz von EPEC an Caco-2-Zellen	94
Abbildung 4. 14 Invasionseffizienz von <i>S. typhimurim</i> in Caco-2-Zellen nach Inkubation mit <i>E. coli</i>	97
Abbildung 4. 15 Invasivität von EcN, EcNDS und <i>S. typhimurium</i> in Caco-2-Zellen	98
Abbildung 4. 16 Invasivität von EcN und <i>S. typhimurium</i> in Caco-2 Zellen.....	99
Abbildung 4. 17 Kontrolle klonierter EcN-Fragmente in pMW82 in der Promotorbank von EcN	100
Abbildung 4. 18 EcN Promotorbank unter dem Fluoreszenzmikroskop	101
Abbildung 4. 19 Sortierung verschiedener Promotorbank-Proben	103
Abbildung 4. 20 Kolonie-Blot sortierter Klone mit EcN-spezifischen Sonden	104
Abbildung 4. 21 Sequenzmotive aus intestinal <i>in vivo</i> regulierten EcN-Promotoren	110
Abbildung 4. 22 Klonierungsstrategie zur Generierung von Promotor- <i>lux</i> -Konstrukten	112
Abbildung 4. 23 Biolumineszenz der <i>lux</i> -Reporterkonstrukte in EcN.....	115
Abbildung 4. 24 Biolumineszenz von EcN pDS15 und EcN pDS19 in LB-Medium und MM-Medium	116
Abbildung 4. 25 Biolumineszenz verschiedener Promotor-Reporter-Konstrukte in EcN	117
Abbildung 4. 26 <i>In vivo</i> Biolumineszenz von EcN pDS15 in Balb/c-Mäusen	120
Abbildung 4. 27 <i>In vivo</i> Biolumineszenz von EcN pDS21 in Balb/c-Mäusen	121
Abbildung 5. 1 Genotypische und phänotypische Diversität nahe verwandter <i>E. coli</i>	131
Abbildung 5. 2 Regulatorisches Netzwerk der CRP- und RpoS-abhängigen Transkription in <i>E. coli</i>	134

8.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. 1 Intestinale und extraintestinale Pathotypen von <i>E. coli</i>	5
Tabelle 1. 2 Probiotische Mikroorganismen	11
Tabelle 1. 3 Wirkmechanismen probiotischer Bakterien	15
Tabelle 1. 4 Klinische Studien mit <i>E. coli</i> Nissle 1917	17
Tabelle 2. 1 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Stammlösungen	22
Tabelle 2. 2 Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien für Bakterienkulturen	23
Tabelle 2. 3 Verwendete Antibiotika und deren Endkonzentrationen im Medium	24
Tabelle 2. 4 Bakterienstämme	25
Tabelle 2. 5 Plasmide	26
Tabelle 2. 6 Medien und Reagenzien für die Zellkultur	27
Tabelle 2. 7 Übersicht über die verwendete Software	28
Tabelle 4. 1 Allgemeine Charakteristika von EcN und 13 weiteren <i>E. coli</i> -Genomen	64
Tabelle 4. 2 Genomische Inseln und Prophagen in EcN	68
Tabelle 4. 3 GI und Prophagen (Φ) von EcN und ihr Vorkommen in <i>E. coli</i> CFT073	75
Tabelle 4. 4 Vorkommen der Virulenzfaktoren von <i>E. coli</i> CFT073 in EcN	77
Tabelle 4. 5 Eisenaufnahmesysteme in verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen	82
Tabelle 4. 6 EcN-Deletionsmutanten EcNDS1 bis EcNDS11	91
Tabelle 4. 7 Testung biochemischer Parameter von EcN, EcNDS1, EcNDS2 und EcNDS3	92
Tabelle 4. 8 Antibiotogramm der Stämme EcN, EcNDS1, EcNDS2 und EcNDS3	93
Tabelle 4. 9 Intestinal <i>in vivo</i> regulierte Gene der Promotorbank von EcN in konventionellen Mäusen	107
Tabelle 4. 10 Intestinal <i>in vivo</i> regulierte Gene der Promotorbank von EcN in gnotobiotischen Mäusen	109
Tabelle 4. 11 Promotorkonstrukte und Kontrollplasmide	114

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Florian Gunzer für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Betreuung meiner Arbeit, das Vertrauen in meine Fähigkeiten, viel Freiheit zur Umsetzung eigener Ideen und die tolle Arbeitsatmosphäre.

Ich danke Frau Prof. Dr. Röske und Herrn Prof. Dr. Buer für die Übernahme der Gutachten.

Herrn Prof. Dr. Jacobs vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der TU Dresden und Herrn Prof. Dr. Suerbaum vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der MH Hannover danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeit in beiden Instituten durchführen zu können.

Mein herzlicher Dank geht an Maike Hartmann, die mich in die Geheimnisse der Molekularbiologie eingeweiht hat und die einfach für mich da war...

Ich danke den ehemaligen Mitgliedern der AG Gunzer in Hannover und den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe in Dresden für die gute Zusammenarbeit, insbesondere Anke Zschüttig für ihren unerschütterlichen Arbeitseinsatz. Vielen Dank auch an Manu, Christoph und Mike als Mitglieder der fast ersten Stunde in Dresden.

Vielen Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der TU Dresden für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung beim Aufbau des Labors nach dem Umzug der Arbeitsgruppe.

Ein großes Dankeschön an Fred Blattner und seine Mitarbeiter von Scarab Genomics LLC in Madison, USA, für vier wundervolle und lehrreiche Wochen, an John und Janet Campbell für die Aktivitäten außerhalb des Laboralltags und an Andria Blattner und Julie Veal für eine wunderbare Unterkunft mit Familienanschluss. Da der Aufenthalt in Madison ohne ein Reisestipendium nicht möglich gewesen wäre, gilt mein Dank auch dem Boehringer Ingelheim Fonds.

Ich danke Helmut Blöcker und allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Genomanalyse des HZI Braunschweig für die Sequenzierungen, Alexander Goesmann und Jochen Blom vom CeBiTec in Bielefeld für die Erfüllung immer neuer Wünsche und Veränderungen im Genom, Matthias Ballmaier vom Sorter-Lab der MHH für die freundliche Hilfe bei der Sortierung der Bakterien und Matthias Gunzer und Priyanka Narang für tolle mikroskopische Aufnahmen.

André Bleich und Anna Smoczek vom ZTL der MHH danke ich für die angenehme Zusammenarbeit, die Hilfe bei der Antragstellung und die Durchführung der Tierversuche.

Das Projekt wurde teilweise finanziert durch ein Stipendium der MHH über das Zentrum für Infektionsbiologie ZIB, das mir viele neue Bekanntschaften und auch Freundschaften gebracht hat. Danke, Maike und Julia, für eine schöne Zeit in Hannover. Den Mädels aus dem Doktorandenzimmer, Catharina, Katja, Maria und Nicol, danke ich für die Unterstützung in allen Lebenslagen, viele schöne Gespräche und eine gute Zeit in Dresden.

Dies alles wäre nicht möglich gewesen ohne meine Eltern und den Rest meiner Familie, die immer für mich da waren. Vielen Dank all meinen Freunden, die mein Leben neben der Arbeit bereichert haben. Und ich danke Alex für seine Unterstützung und Liebe in allen Phasen der Doktorarbeit. Danke!

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2004 bis Januar 2009 unter der Leitung von Prof. Dr. med. Florian Gunzer am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Medizinischen Hochschule Hannover und am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus an der Technischen Universität Dresden durchgeführt.

Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dorothea Schmidt